



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

El papel de la microbiota intestinal en el cáncer colorrectal

The role of gut microbiote in colorectal cancer

Autor/a: Carlos Perea Alfaro

Director/es: Asunción Seoane Seoane

Santander, Junio 2020

Índice

Resumen.....	1
Introducción	2
Objetivos	3
Metodología	3
Microbiota intestinal.....	3
Métodos de detección de la microbiota intestinal	4
Establecimiento de la microbiota intestinal.....	6
Biogeografía de la microbiota intestinal	7
Variación global de los metagenomas intestinales. Enterotipos	9
Funciones de la microbiota intestinal	13
Factores que determinan el cáncer colorrectal (CRC)	15
Papel de la dieta y el estilo de vida en el cáncer colorrectal	18
Microbiota intestinal asociada al cáncer colorrectal	21
Microorganismos relacionados con el CRC	23
Rutas metabólicas enriquecidas en el microbioma de los pacientes con CRC	28
Papel del biofilm en la iniciación del CCR.....	29
Impacto de la microbiota intestinal en la eficiencia y toxicidad de las terapias contra el CCR....	30
Integración de los datos del microbioma en la medicina de precisión para la prevención, diagnóstico y tratamiento del CCR.....	33
Modificación de la microbiota intestinal con fines terapéuticos.....	35
Conclusiones	39
Abreviaturas	40
Bibliografía	41
Agradecimientos	46

Resumen

Durante los últimos años el número de investigaciones realizadas en el campo de la microbiota intestinal y su repercusión en el organismo ha crecido exponencialmente. Además de profundizar sobre las funciones que ejerce y sus mecanismos de acción, la microbiota intestinal se ha relacionado con diversas patologías estableciéndolas como un factor importante tanto en la etiología, diagnóstico y tratamiento de ellas. De esta forma una de las implicaciones más estudiadas de la microbiota intestinal, es el papel que ejerce en una de las neoplasias más prevalentes, el carcinoma colorrectal (CCR). En esta revisión se aborda su grado de implicación en la patología y cómo afecta en origen, desarrollo y cómo se postula como una nueva arma el tratamiento de la enfermedad. Desde hace varias décadas la patogenia del CCR se ha descrito como una enfermedad multifactorial donde las variaciones genéticas y los factores ambientales conformaban el modelo etiopatogénico, sin embargo en los últimos años gracias al avance en el conocimiento de los microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal, se ha descrito un nuevo punto de vista a la hora de entender mejor la enfermedad. El conocer el papel exacto que desempeña la microbiota intestinal en el CCR ofrece un amplio abanico de posibilidades para incidir sobre la enfermedad y conocer con exactitud todos los mecanismos implicados en su desarrollo.

Abstract

During the last few years, the number of investigations carried out in the field of gut microbiota and its impact on the human body has grown exponentially. Furthermore, in addition to deepening on the functions and its mechanism of action, the intestinal microbiota has been related to various pathologies establishing itself as an important factor in the etiology, diagnosis and treatment of them. Thus, one of the most studied implications of the intestinal microbiota is the role it plays in one of the most prevalent neoplasms, colorectal carcinoma (CRC). This review addresses its degree of involvement in the pathology and how it affects its origin, development and how it is postulated as a new weapon in the treatment of the disease. For several decades, the pathogenesis of CRC has been described as a multifactorial disease where genetic variations and environmental factors made up the etiopathogenic model; however, in recent years, thanks to advances in the knowledge of the microorganisms that inhabit the gastrointestinal tract, a new point of view has been described when it comes to understanding the disease. Therefore, understanding the exact role of gut microbiota plays in CRC offers a wide range of possibilities to affect the disease and to know exactly all the mechanisms involved in its development.

Introducción

Dentro de las enfermedades oncológicas, el carcinoma colorrectal (CCR) se sitúa como una de las principales causas de mortalidad tanto en varones como en mujeres, además de representar en cómputos globales una de las neoplasias más prevalentes. Aunque la tasa de mortalidad se haya reducido ligeramente en los últimos años gracias a un avance en técnicas de cribado precoz de la enfermedad, se calcula que cada año se detectan solo en Estados Unidos más de 100.000 casos y fallecen más de 40.000 personas. Estos hechos incurren en un aumento de las investigaciones para determinar con exactitud todos los determinantes que engloban a la enfermedad, con el objetivo de mejorar el pronóstico de los pacientes afectados. En este contexto y con un auge de la literatura científica en relación a la microbiota intestinal, se ha visto una implicación clara de esta englobando varios aspectos de la enfermedad. El colon humano da cabida a una enorme variedad de microorganismos que habitan en estado de simbiosis con el huésped, ejerciendo una gran variedad de funciones claves en el organismo. Desde nuestro nacimiento, aunque la microbiota intestinal esté sujeta a una continua variación en su composición debido en gran parte a factores ambientales, las características tanto cualitativas como cuantitativas de esta se mantienen, preservando en todo momento una correcta homeostasis intestinal. Sin embargo, en determinadas circunstancias, un aumento de patógenos oportunistas puede romper el estado de equilibrio de la microbiota variando su composición y estructura. Este concepto se denomina disbiosis y se ha relacionado en los últimos años con diferentes patologías, entre ellas el CCR. A través de diferentes muestras obtenidas de pacientes afectados de la enfermedad, se ha demostrado la presencia de patógenos bacterianos en el tejido cancerígeno además de diversas alteraciones del ambiente colónico que abarcan desde alteraciones metabólicas a estructurales. En esta revisión resumimos los principales determinantes de la microbiota intestinal en relación a la fisiopatogenia del CCR y cómo esta puede influir en todos los eslabones de la enfermedad estableciéndose como una posible variable a utilizar en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

Objetivos

Analizar el grado de implicación de la microbiota intestinal en el carcinoma colorrectal a través de la evidencia científica más reciente, enfocando su posible uso en relación al diagnóstico, tratamiento y pronóstico de dicha enfermedad.

Metodología

La sistemática seguida para la realización del trabajo se basa en una revisión bibliográfica. Los artículos en los que se basa el proyecto han sido extraídos de dos de las bases de datos más utilizadas en las Ciencias de la Salud, Pubmed y Scopus. Así mismo se han seleccionado aquellos artículos con un mayor peso en relación al tema elegido y con una fecha de publicación más reciente con el objetivo de incorporar la información más actual y con mayor evidencia.

Microbiota intestinal

Tras las primeras pinceladas en el mundo de la microbiología con Anton van Leeuwenhoek en el año 1683 observando por primera vez una bacteria o con Louis Pasteur y sus grandes aportaciones dando entrada a la conocida como la «Edad de Oro de la Microbiología», Ilya Metchnikov, científico ucraniano ganador del Premio Nobel en 1908, postuló que las denominadas bacterias ácido lácticas (BAL) proporcionaban beneficios significativos a la salud y con ello su posibilidad de aumentar la longevidad. Años después se comienzan a asentar las bases que posteriormente darán términos como microbioma (cada uno de los genes que codifica la microbiota) o microbiota (conjunto de microorganismos localizados en el ser humano).

La microbiota incluye no solo bacterias, sino también otros microorganismos como hongos, arqueas, virus y protozoos (Jandhyala, et al. 2015). La colección de bacterias, arqueas y eucariotas que colonizan el tracto gastrointestinal se denomina "microbiota intestinal" y ha evolucionado junto con el huésped durante miles de años para formar una relación compleja y mutuamente beneficiosa. Se ha estimado que en el intestino habitan 1800 géneros y aproximadamente 15.000-36.000 especies de bacterias con un total que supera los 10¹⁴, con ~10 veces más células bacterianas que el número de células humanas y más de 100 veces la cantidad de contenido genómico (microbioma) que el genoma humano (25.000 genes). Sin embargo, una estimación revisada recientemente ha sugerido que la proporción de células humanas a células bacterianas es en realidad más cercana a 1: 1 (Sender, et al 2016). Como resultado de la gran cantidad de células bacterianas en el cuerpo, el huésped y los microorganismos que lo habitan a menudo se denominan "superorganismos" (Thursby and Juge 2017).

Aunque los dominios *Eukarya* y *Archaea* también están presentes en el intestino, son las bacterias las que predominan claramente. Los humanos adultos son colonizados

por microbios de 12 *phylum* o divisiones de bacterias y al menos una división de *Archaea*. La microbiota intestinal está dominada por 3 *phyla* bacterianos: *Firmicutes* (Gram-positivas) (60%), *Bacteroidetes* (Gram-negativas) (25%) y *Actinobacteria* (Gram-positivas) (8%) y ya en menor proporción están *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Spirochaetes* (Thursby and Juge 2017).

Métodos de detección de la microbiota intestinal

El proceso de la detección y la codificación de la microbiota, ha sido una tarea delicada y ardua que ha ido evolucionando a lo largo de las décadas. El objetivo principal consiste en caracterizar la estructura y la diversidad de la comunidad microbiana.

Para determinar la composición de la microbiota, hasta hace unos años se utilizaban cultivos microbiológicos, pero con estos métodos tradicionales solo se consigue cultivar el 10% -25% de la microbiota intestinal debido a que la mayoría de los microorganismos son anaerobios (Jandhyala et al. 2015). Esto se debe principalmente a la incapacidad de reproducir con precisión las características de su hábitat. Posteriormente, gracias al desarrollo de los cultivos anaerobios, los géneros dominantes que se aislaron fueron *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, etc (Jandhyala et al. 2015).

Sin embargo, el cultivo sigue siendo esencial para conocer el papel de muchos de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal, recientemente se han producido algunos avances como la denominada “culturómica microbiana” consistente en detectar el máximo número de bacterias posible presentes en una muestra para identificar un rango de microbiota previamente no cultivada del intestino. Esta técnica se basa en utilizar múltiples condiciones de cultivo asociadas a la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*). Si la identificación por MALDI-TOF no es posible se recurre a la identificación por 16S rRNA (Amrane, et al 2018).

Actualmente, las técnicas moleculares basadas en la secuenciación masiva han permitido identificar y asignar taxonómicamente a la mayoría de los microorganismos sin necesidad de cultivarlos. El paso más crítico en todo el proceso es la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, habitualmente ADN, ya que se necesita conseguir buena cantidad y calidad sin arrastrar sustancias que puedan inhibir las reacciones de PCR. Normalmente se utilizan muestras fecales (muestras no invasivas) o bien muestras de mucosa obtenidas mediante biopsia. Las muestras fecales, no siempre representan toda la diversidad microbiana del intestino de tal forma que las bacterias de los tramos superiores pueden no estar bien representadas. En cuanto a las biopsias de colon, tienen el problema de su carácter invasivo, además representan solo la microbiota de un punto concreto, y requieren preparación intestinal para los procedimientos endoscópicos tal como la utilización de enemas lo que puede modificar la composición de la microbiota.

El estudio de la microbiota intestinal consta de dos etapas principales: análisis metagenómico y análisis bioinformático. La metagenómica, originalmente usada para estudiar los ecosistemas complejos del ambiente, es la herramienta más usada para estudiar los miembros no cultivables de la microbiota. Utilizando la secuenciación masiva del ADN, se puede secuenciar el ADN que codifica para el 16S rRNA y/o el ADN de la toda la comunidad presente en la muestra.

La técnica más usada para la identificación de taxones microbianos es la secuenciación del gen rRNA 16S, esto es debido a que la secuencia de ADN del gen que codifica para rRNA 16S está presente en todos los procariotas y a la existencia de dominios variables que permiten distinguir diferentes taxones (Malla, et al. 2019). Esta región 16S del gen bacteriano es pequeña (tamaño de alrededor de 1,5 Kb) y altamente conservado, con 9 regiones hipervariables (V1 – V9) que han divergido lo suficiente como para permitir la resolución a nivel de género y especie (Jandhyala et al. 2015). Estas regiones hipervariables están flanqueadas por tramos conservados, lo que permite la amplificación por PCR de secuencias variables utilizando cebadores "universales".

Las regiones más usadas para la identificación bacteriana en 16S rRNA son las V3, V4, V6 y V8 principalmente. A partir de una muestra de heces a la que se extrae el ADN total, se amplifica por ejemplo la región V3 o la V3-V4 del gen ADNr 16S con cebadores universales y posteriormente los amplicones se someten a secuenciación masiva. Seguidamente, se agrupan las lecturas del 16S en unidades taxonómicas operativas (OTU) que representan organismos similares y se deduce la filogenia y la identidad taxonómica en función de un porcentaje umbral de similitud de secuencia (generalmente 97%). Hay que tener en cuenta que la evaluación de la diversidad de la comunidad microbiana puede estar sesgada debido a la variabilidad en el número de copias 16S rRNA dentro y entre las OTUs. Además, la secuenciación del 16S rRNA solo proporciona información sobre la composición taxonómica de la comunidad pero no las funciones biológicas asociadas con cada OTU (Malla, et al. 2019). A pesar de ello, para comunidades que están muy bien representadas por genomas de referencia completos, como es el intestino humano, es posible inferir indirectamente las funciones biológicas computacionalmente.

El otro abordaje de los estudios metagenómicos de la microbiota intestinal consiste en la secuenciación masiva de ADN de toda la comunidad presente en la muestra. La información proporcionada es mayor ya que es capaz de mostrar relaciones entre enzimas microbianos, rutas metabólicas y expresión génica, permitiendo además estudiar cómo las alteraciones en la composición microbiana influyen en el contenido de genes y la expresión de los mismos. Este método es conocido como «shotgun» (secuenciación de fragmentos aleatorios) y permite leer las secuencias de fragmentos de ADN sin amplificación previa (Malla, et al. 2019). El conjunto de todos estos fragmentos se considera representativo del conjunto de los genomas bacterianos presentes en la microbiota original.

La secuenciación masiva de ADN ha sido empleada en estudios a gran escala como el Proyecto Human Microbiome (HMP) con sede en EE. UU (plataforma 454 de Roche) y el MetaHit con sede en Europa (plataforma de Illumina). La plataforma 454 se basa en la pirosecuenciación, en la que cada nucleótido incorporado en la cadena de ADN está

acompañado por la liberación de una molécula de pirofosfato. Este pirofosfato tras una serie de reacciones posteriores es capaz de producir una señal fluorescente directamente proporcional al número de nucleótidos incorporados. En el caso de Illumina, la secuenciación masiva y paralela ocurre en un proceso gradual. Primero, la muestra de ADN se corta en fragmentos cortos y se liga a "adaptadores" de oligonucleótidos sintéticos para generar una librería. Esta tecnología usa nucleótidos marcados con fluorocromos y terminadores reversibles, permitiendo así una secuenciación masiva y paralela en millones de fragmentos de ADN. Las lecturas son cortas, de 35 nucleótidos. Como versiones mejoradas están el Illumina Genome Analyzer II (longitudes de lectura de hasta 300 pb) o el Illumina HiSeq (Malla, et al 2019).

La metagenómica puede complementarse con otras técnicas ómicas como la metatranscriptómica, la proteómica o la metabolómica y junto con la información clínica y dietética, se pueden obtener modelos mecanicistas que expliquen la estructura y función del microbioma (Shabana, et al 2018). La metatranscriptómica (análisis del ARN total de una comunidad biológica), se ha utilizado para observar la composición de la microbiota activa en individuos sanos y ha revelado que el perfil transcripcional entre individuos es más similar al indicado por la diversidad taxonómica observada. La metaproteómica permite asociar genotipos a fenotipos de comunidades microbianas mediante la detección de componentes catalíticos funcionales. La metabolómica permite analizar miles de metabolitos simultáneamente y proporciona perfiles metabólicos globales de un individuo en tiempo real. La combinación de perfiles metabólicos y estudios metagenómicos permite el estudio del metabolismo del huésped y microbiano con gran detalle (Gutleben et al. 2018).

Establecimiento de la microbiota intestinal

Generalmente se cree que el desarrollo de la microbiota intestinal comienza tras el nacimiento, aunque este concepto se ha puesto en duda a raíz de una serie de estudios que identificaron microorganismos no patógenos de *phyla* tales como *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria* en la primera deposición del recién nacido (meconio), lo que lleva a pensar en un desarrollo más precoz de lo establecido (Shabana, et al. 2018).

Los cambios tras el nacimiento (dieta, enfermedades, tratamientos...) desembocan en una colonización del tránsito gastrointestinal dependiendo de los factores a los que someta el organismo. Asimismo el nacimiento de un bebé a término por vía vaginal tendrá un mayor contenido de lactobacilos en su microbiota durante sus primeros días de vida (reflejo de la gran cantidad de lactobacilos que se encuentran en condiciones normales en la flora vaginal). Por el contrario un neonato nacido por cesárea va a tener un retraso en la colonización por el género *Bacteriodes* y un aumento de dicha colonización por microorganismos que predominan en el piel tales como los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* (Thursby and Juge 2017). Aún teniendo en cuenta las diferentes características en la composición de la microbiota según el modelo de parto, estudios recientes sugieren que dicha

microbiota se normaliza al microbioma de la progenitora a las 6 semanas del parto independiente de la conducta seguida al nacimiento (Shabana, et al 2018). Una de las variables que también afecta a la composición de la microbiota en los primeros meses de vida es el tipo de nutrición que se lleve a cabo. Así en la lactancia materna predomina la microbiota dominada por *Bifidobacterium* y *Ruminococcus* y en contraposición en la alimentación artificial con preparados predominan *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* y *Lactobacillus spp.*

Como patrón general, en las primeras etapas de desarrollo, la microbiota es de baja diversidad predominando principalmente dos *phyla*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. Durante los meses consecutivos tanto el crecimiento como la variedad de la microbiota crece adaptándose a las características de cada sujeto formando un patrón que es único en cada sujeto. Alrededor de los 2,5 años de edad las características de la microbiota se asemejan a las de un adulto (Thursby and Juge 2017). Aunque el efecto materno es el factor más temprano que tiene una gran significación en la composición de la microbiota, el impacto del medio ambiente y de factores externos determina principalmente dicha variación.

Biogeografía de la microbiota intestinal

Como previamente se mencionó la microbiota intestinal adulta está formada por cientos y miles de especies dominadas principalmente por los *phyla* *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Su composición no es fija a lo largo del tubo digestivo (desde boca hasta ano), lo que implica que dependiendo del segmento anatómico donde nos encontremos podemos encontrar diferentes predominios tanto a lo largo del eje longitudinal como en la sección transversal. Además determinados factores como gradientes químicos (por ejemplo, pH), niveles de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y factores inmunológicos son clave para impulsar dicha variabilidad (Tropini et al. 2017). Además, la histología de la pared del tubo digestivo también es un factor importante que determina la biogeografía. Las paredes del intestino delgado, recubiertas por menor cantidad de moco que el colon, están formada por vellosidades y criptas que son colonizadas por microorganismos con gran capacidad adherente tales como bacterias filamentosas segmentadas (SFB), *Lactobacillus* y *Helicobacter spp* (Tropini et al. 2017). Por otra parte, el colon posee una capa de moco que es más abundante y donde distinguimos: una capa externa con predominio de bacterias que degradan la mucina tales como *Bacteroides acidifaciens*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacteriaceae* y *Akkermansia muciniphila* y una capa interna más estéril con microorganismos fuertemente adheridos a las criptas como *Bacteroides fragilis* y *Acinetobacter spp* (Tropini et al. 2017). Al igual que la composición de la microbiota, el moco varía a lo largo el colon, volviéndose más denso y continuo a lo largo de toda su longitud hacia el recto, en parte debido a la disminución del contenido de agua (Tropini et al. 2017).

El intestino delgado posee un ambiente ácido y con niveles altos de oxígeno que influyen en la presencia de menor cantidad de microorganismos. Además es importante tener en cuenta que los ácidos biliares secretados en esta porción proximal

del tubo gastrointestinal tienen un carácter bactericida para ciertas especies, determinando así la microbiota de la zona. Lo predominante en esta región del tubo digestivo son anaerobios facultativos los cuales poseen un fenotipo que los dota de resistencia ante los ácidos biliares y antimicrobianos (Donaldson, et al 2016). Entre los *phyla* más abundantes tenemos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* y dentro de las familias *Lactobacillaceae* y *Enterobacteriaceae* (Fig.1).

El intestino grueso por su parte alberga las comunidades de microorganismos más densas y variables dentro de los hábitats corporales, siendo por tanto el principal nicho de colonización del cuerpo humano. El aumento del pH, la reducción en la concentración de ácidos biliares son algunos factores que motivan este aumento de diversidad en la microbiota. La mayor parte son bacterias anaerobias capaces de digerir hidratos de carbono complejos que no se han digerido en segmentos superiores. Así, en el colon es dominante el *phylum Bacteroidetes* con familias como *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae* (Nistal et al. 2015a). En menor medida encontramos *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*. Los microorganismos gram-positivos como *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* también son especialmente dominantes. Haciendo mención a los gram-positivos que forman esporas tenemos principalmente al género *Clostridium*. Por último y en menor medida en el intestino *grueso* aparecen anaerobios facultativos como enterobacterias, enterococos, lactobacilos y estreptococos fundamentales para la homeostasis microbiana (Nistal et al. 2015a).

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Predominant families in the:

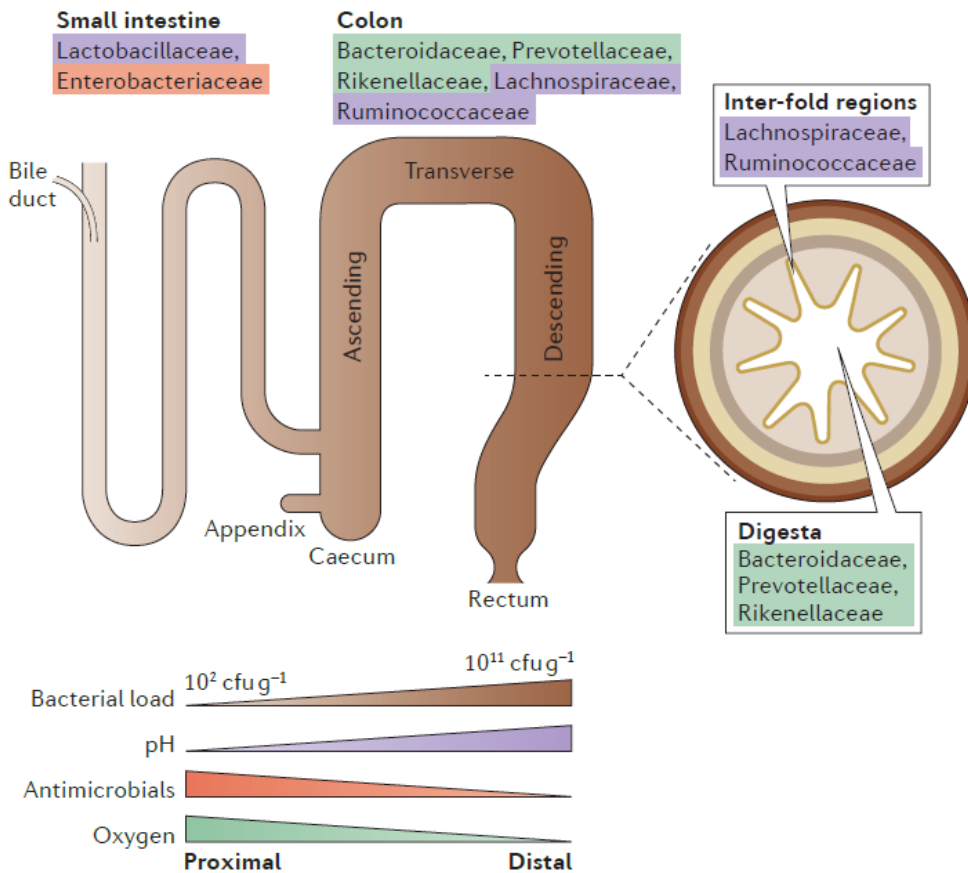


Figura 1. Hábitats microbianos en el tracto gastrointestinal inferior humano. Los *phyla* dominantes en el intestino son *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*. Las familias bacterianas dominantes del intestino delgado y el colon reflejan diferencias fisiológicas a lo largo del intestino. Gradiente de oxígeno, péptidos antimicrobianos (incluidos los ácidos biliares, secretados por el conducto biliar) y el pH limitan la densidad bacteriana en el intestino delgado, sin embargo, en el colon se observa una alta carga bacteriana. En el intestino delgado, dominan las familias *Lactobacillaceae* y *Enterobacteriaceae*, mientras que el colon se caracteriza por la presencia de especies de las familias *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*. (Adaptado de Donaldson, et al 2016).

Variación global de los metagenomas intestinales. Enterotipos

Como ya se ha mencionado anteriormente, tanto el Proyecto de Microbioma Humano como el MetaHit (estudio europeo del metagénooma del tracto intestinal humano) han utilizado la secuenciación masiva paralela a gran escala para la caracterización de la microbiota intestinal saludable así como en el estado de enfermedad. El HMP se llevó a cabo en 10 años y en dos fases. En la primera fase estudió la diversidad de la microbiota en múltiples sitios del cuerpo, en sujetos sanos, para determinar la composición de referencia del microbioma humano sano. En la segunda fase, el denominado Proyecto Microbioma Humano Integrativo (HMP) estudió los cambios

dinámicos del microbioma en tres situaciones: embarazo, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y prediabetes (Fig. 2)

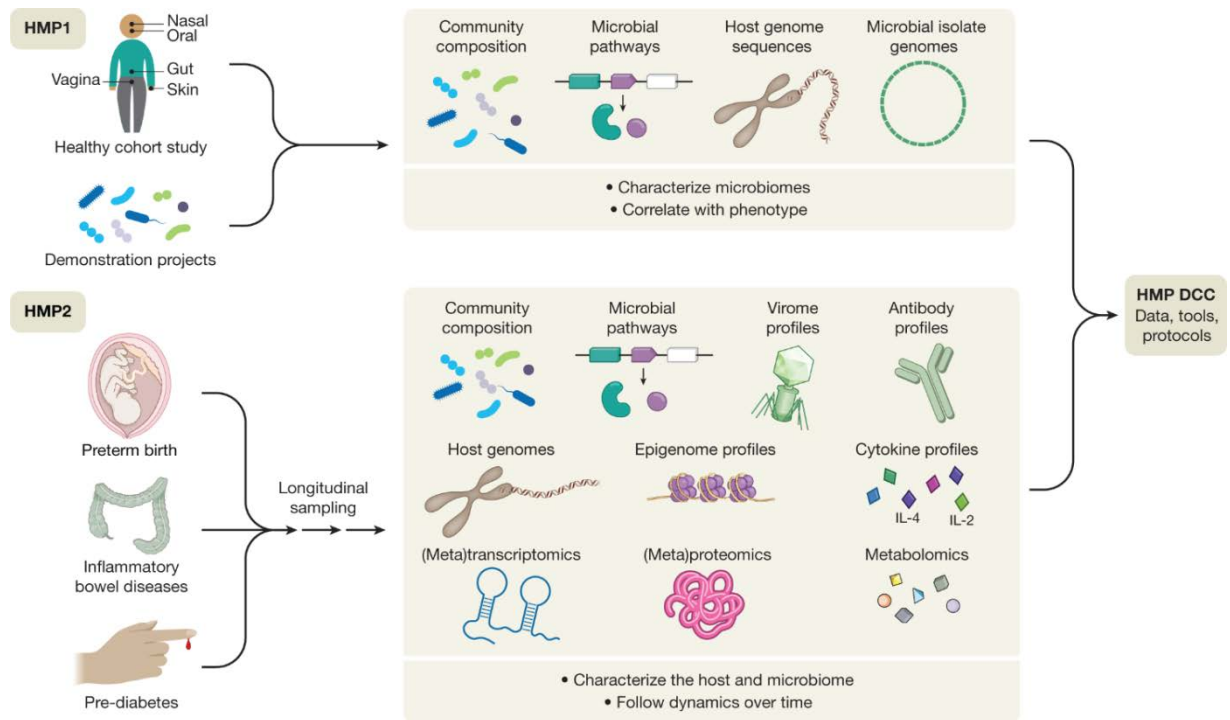


Figura 2. Primera y segunda fase del Proyecto de Microbioma Humano (HMP) de NIH

El HMP1 se centró en la caracterización de comunidades microbianas de numerosos sitios del cuerpo (oral, nasal, vaginal, intestinal y de la piel) de sujetos adultos sanos incluyendo también un conjunto de proyectos basados en enfermedades o trastornos específicos. El HMP2 se centró en afecciones asociadas con el microbioma: embarazo y parto prematuro (microbiomas vaginales de mujeres embarazadas), enfermedades inflamatorias del intestino (microbioma intestinal) y prediabetes (microbiomas del intestino y nasales) («The Integrative Human Microbiome Project» 2019).

El MetaHIT se centró en estudiar la correlación entre el microbioma intestinal y las patologías intestinales, especialmente la obesidad y la EII. Para ello, este consorcio secuenció el ADN fecal de una cohorte de 124 individuos, incluidos sujetos sanos y aquellos con EII y obesidad, estableciendo un catálogo de genes no redundantes del tracto intestinal. Este proyecto mostró que el 40% de los genes eran compartidos entre la mayoría de los individuos representando un metagenoma central. También se encontró que el 99.1% de los genes eran de origen bacteriano, y la mayoría de los genes restantes eran de arqueas y un número relativamente pequeño de genes eucariotas y virales.

Los datos del MetaHIT y del Proyecto de Microbioma Humano permitieron identificar 2172 especies que fueron clasificadas en 12 *phyla* diferentes, de los que el 93.5% pertenecían a *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. Tres de los 12 *phyla* identificados contenían solo una especie aislada del hombre, incluida una especie intestinal, *Akkermansia muciniphila*, el único representante conocido del *phylum Verrucomicrobia*. 386 de las 2172 especies identificadas eran estrictamente anaeróbicas por lo que probablemente se alojarán en regiones de la mucosa oral y del tracto gastrointestinal (Thursby and Juge 2017).

Cada individuo posee un determinado material genético que le hace único y distinto a los demás, y podría compararse a una huella digital. Dicho concepto se incluye dentro del microbioma intestinal el cual presenta una enorme variabilidad y heterogeneidad que le confieren un papel clave en el desarrollo humano. Esta gran variabilidad ha sido considerada un gran obstáculo a la hora de utilizar aplicaciones médicas basadas en el microbioma intestinal (Cheng and Ning 2019). Sin embargo a través del estudio realizado por Arumugan y colaboradores en el cual incluyeron a 33 muestras de diferentes poblaciones se pudo observar que estas muestras se podían estratificar en 3 grupos diferentes basados en la mayor abundancia de uno de los tres géneros siguientes: Enterotipo 1 (*Bacteriodes*), enterotipo 2 (*Prevotella*) y enterotipo 3 (*Ruminococcus*) (Arumugam et al. 2011). Posteriormente, diversos estudios concluyeron que solo podían ser estratificadas atendiendo a 2 enterotipos principalmente *Bacteriodes* y *Prevotella* quedando el enterotipo *Ruminococcus* integrado en los anteriores debido a su menor importancia en el microbioma intestinal (Cheng and Ning 2019).

La estratificación en enterotipos, sugiere la existencia de diferencias funcionales entre los tres enterotipos. Así, el enterotipo 1 se ha asociado a dietas enriquecidas en proteínas animales y grasas saturadas y esto es soportado por el hecho de que en este enterotipo hay una gran proporción de bacterias del género *Bacteroides* ricas en enzimas especializados en la degradación de carbohidratos animales (hexoaminidasas y galactosidasas) y con gran potencial sacarolítico y proteolítico. Sin embargo, el enterotipo 2 se ha relacionado con dietas no occidentales y/o ricas en fibra, debido a que *Prevotella* está especializada en la degradación de las fibras vegetales y además se ha encontrado un potencial de fermentación lipolítico y proteolítico disminuido en este enterotipo (Costea et al. 2018). En general sujetos que llevan a cabo una dieta variada con alto contenido en frutas, verduras y fibra se asocia con una composición en la microbiota con mayor riqueza y diversidad donde encontramos una mayor abundancia de microorganismos fermentadores de hidratos de carbono del *phylum Firmicutes* tales como *Ruminococcus bromii*, *Roseburia* y *Eubacterium rectal*.

Inicialmente se estableció que los enterotipos eran relativamente estables en el tiempo, con la posibilidad de pequeñas variaciones dentro de unos límites normales. Sin embargo, se ha observado que los enterotipos no son tan estables como se pensaba variando además de con la dieta, con la edad y los antibióticos. En relación a la edad, la estabilidad y composición de la microbiota varían en gran medida a través

de las diferentes etapas de la vida humana (infancia, niñez, edad adulta y vejez) (Cheng and Ning 2019).

Como ya se mencionó anteriormente la microbiota de los recién nacidos es muy inestable y varía en función de múltiples parámetros tales como el tipo de alumbramiento, alimentación etc. La microbiota infantil se ha visto el predominio de *Bacteroides*, *Prevotella* y *Bifidobacterium*. En personas mayores de 65 años vemos un aumento relativo del *phylum Bacteroidetes* y de *Clostridium* cluster IV y como contraposición en sujetos jóvenes hay mayor prevalencia de *Clostridium* cluster XIVa (Thursby and Juge 2017). La microbiota en pacientes centenarios también exhibió diferencias tales como un aumento en la abundancia de anaerobios facultativos (*Escherichia coli*) y un cambio en el perfil de microorganismos productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato. En general la producción de AGCC y la amilólisis se ven reducidos en sujeto de avanzada edad a la vez que aumenta la proteólisis (Thursby and Juge 2017).

Otro factor importante que puede afectar al conjunto de la microbiota intestinal es la toma de antibióticos. Se ha visto que el tratamiento con antibióticos altera drásticamente el equilibrio microbiano a corto y largo plazo, incluyendo disminuciones en la riqueza y diversidad de la comunidad (Thursby and Juge 2017). Antibióticos tales como ciprofloxacino, claritromicina, clindamicina se han relacionado con alteración de la microbiota en diferentes periodos de tiempo. Además el uso de este último (clindamicina) supone la principal causa de diarrea en pacientes intrahospitalarios debido a una colitis pseudomembranosa producida por *C. difficile*, debido a una alteración en la disponibilidad de carbohidratos de la mucosa como consecuencia del tratamiento, favoreciendo su expansión en el intestino. Por otra parte la terapia intravenosa de β -lactámicos tales como ampicilina, sulbactam y cefazolina afecta tanto al conjunto microbiano como a la producción de metabolitos clave, como acetilfosfato y acetil-CoA, que participan en diversas funciones celulares. Además el uso de antibióticos no solo se ha relacionado con las alteraciones ya mencionadas en la microbiota o por el aumento de incidencia de infecciones, también estudios recientes en ratones demostraron que la disminución de la microbiota por los antibióticos afectaron el metabolismo secundario de los ácidos biliares y la serotonina en el colon, lo que provocó un retraso en la motilidad GI (Thursby and Juge 2017).

Por último otros factores menos prevalentes que pueden alterar la microbiota son el uso de probióticos, donde se ha visto que pueden mejorar la composición corporal y factores metabólicos, el uso de prebióticos los cuales han demostrado promover el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos y procedimientos invasivos como el bypass gástrico en Y de Roux o el trasplante fecal (Shabana, et al. 2018).

La observación de que los enterotipos no son tan estables como se pensaba variando con la edad, dieta y antibióticos e incluso la estratificación es diferente dependiendo del método de estudio empleado, ha llevado a la creencia de que los enterotipos son más continuos que discretos, tal como se observa en la Figura 3 (Cheng and Ning 2019).

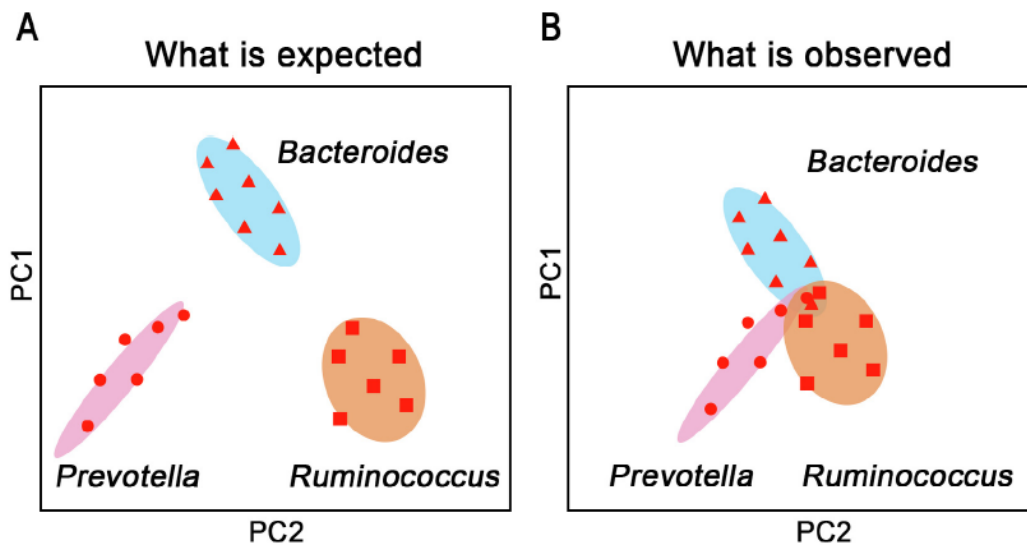


Figura 3. Los enterotipos podrían ser continuos (B) más que discontinuos (A) (Adaptado de Cheng and Ning 2019).

Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal mantiene una estrecha simbiosis con la mucosa intestinal e imparte una serie de funciones metabólicas, de carácter inmune y protectoras del individuo, claves para un adecuado establecimiento de la homeostasis interna. En los últimos años han aumentado exponencialmente las investigaciones para conocer el papel exacto que juega la microbiota en nuestro organismo y su grado de repercusión. Así el desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal, conocida como disbiosis, puede provocar tanto trastornos inmunológicos como patologías no intestinales: Obesidad, síndrome metabólico, diabetes, enfermedades cardiovasculares... (Shabana, et al. 2018).

Función metabólica: Una de las funciones clave de la microbiota intestinal es el metabolismo de nutrientes, principalmente la fermentación los hidratos de carbono complejos no digeridos en regiones proximales del tubo gastrointestinal y oligosacáridos, por familias de microorganismos como *Bacteroides* (principalmente), *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* y enterobacterias (Jandhyala, et al. 2015). Como resultado de dicho proceso se obtienen los conocidos ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que constituyen una fuente de energía importante para el huésped. No solo se ha demostrado que la microbiota interactúa con los hidratos de carbono, ya que esta ejerce un papel positivo ante el metabolismo de los lípidos, inhibiendo la lipoproteína lipasa en los adipocitos. En el papel del otro macronutriente principal, las proteínas, la microbiota posee una fuerte maquinaria de metabolización proteica a través de peptidasas microbianas sumada a la capacidad metabólica de las enzimas

humanas. En este contexto varios transportadores de aminoácidos localizados en las membranas bacterianas provocan su translocación del lumen intestinal al citoplasma bacteriano donde se transforman en péptidos de señalización y moléculas antimicrobianas (Jandhyala, et al. 2015). Otra función importante derivada del metabolismo es la síntesis de la vitamina K clave para la hemostasia, la síntesis de metabolitos de la vitamina B y de ácido linoléico conjugado (ALC) además de la capacidad de desconjugar ácidos biliares primarios formando ácidos biliares secundarios, los cuales poseen un gran efecto lipotrópico. Esta acción está realizada por microorganismos como *Bacteroides intestinalis* y en menor medida por *Bacteroides fragilis* y *E. coli* (Shabana, et al. 2018). Por último destacar que diversos estudios han demostrado que la microbiota también interviene en la descomposición de polifenoles, estos compuestos presentes en plantas son metabolizados y posteriormente absorbidos, difundiéndose al territorio sistémico donde ejercen un papel antimicrobiano además de diversas acciones metabólicas (Jandhyala, et al. 2015).

Función en el metabolismo xenobiótico: La microbiota presenta un importante papel en la eliminación de compuestos o sustancias extrañas al organismo, lo que se conoce como metabolismo xenobiótico. Por ejemplo estudios recientes han demostrado que un metabolito intestinal (p-cresol) puede reducir la capacidad del hígado para metabolizar paracetamol en el citocromo p450 debido a la inhibición de las sulfotransferasas hepáticas. También, se ha observado que los glucósidos cardíacos como la digoxina activan un operón que contiene citocromo en el organismo *Eggerthella lenta*, bacilo Gram positivo anaerobio del *phylum Actinobacteria*, lo que resulta en la inactivación de la digoxina. Por lo tanto estos compuestos pueden modificarse por la actividad de la microbiota intestinal. Este proceso puede activar medicamentos, cambiar su biodisponibilidad o incluso producir compuestos tóxicos (Cani and Jordan 2018).

Función antimicrobiana: Otra función clave que desempeña la microbiota intestinal es la protección antimicrobiana. En el tracto gastrointestinal las células epiteliales juegan un papel esencial en la transmisión de información a las células inmunitarias situadas en las criptas intestinales llamadas células de Paneth. Así el reconocimiento y vigilancia de microorganismos es llevado a cabo por el sistema inmune innato a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que incluye receptores tipo Toll (TLRs) y receptores tipo NOD (NDR). Los TLRs son receptores de transmembrana que se expresan en superficies celulares o en compartimentos endolisosómicos, en cambio los NDR son proteínas citosólicas (Cani and Jordan 2018).

Los PRRs son activados posteriormente por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que incluyen varios componentes microbianos como el peptidoglicano, LPS, lípido A, flagelos, ADN/ARN etc. Dicho diálogo cruzado entre los PRRs y PAMPs dará lugar a la activación de varias vías de señalización que son esenciales para promover la integridad de la mucosa intestinal, para la producción de proteínas antimicrobianas (AMP) e IgA (Jandhyala, et al. 2015). Aunque en condiciones normales la microbiota sana es el requisito clave para la producción de AMP, se ha visto que *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Lactobacillus innocua* parecen estar entre las especies determinantes para el impulso de dicha producción (Jandhyala, et al. 2015).

Función inmunomoduladora: Otro mecanismo regulador de la microbiota intestinal es el de controlar el excesivo crecimiento de cepas patógenas a través de la producción de inmunoglobinas locales. Se ha visto que determinados microorganismos como *Bacteriodes* activan las células dendríticas que inducen a las células plasmáticas para la producción de IgA secretora (sIgA). Esta además, puede recubrir la microbiota predominantemente con la subclase sIgA2 la cual es más resistente a la degradación por proteasas bacterianas. Este mecanismo es clave, ya que impide el proceso de translocación bacteriana del lumen a la circulación sistémica (Jandhyala, et al. 2015). Además la secreción de sIgA y su posterior unión a las bacterias comensales contribuye a la formación de biopelículas mucosas que sirven de barrera a la adherencia de patógenos (Donaldson, et al 2016). En una serie de estudios gnotobióticos demostraron que el recubrimiento experimental de *B. thetaiotamicrón* con sIgA reduce la aptitud microbiana pero como contraposición conduce a una reducción en la señalización inflamatoria y a cambios en la expresión genética de bacterias (Donaldson, et al 2016). Así gracias a estos mecanismos, la sIgA media la homeostasis entre el huésped y la microbiota, y entre el huésped y los posibles patógenos de la superficie de la mucosa.

Adicionalmente la microbiota intestinal contribuye a la inmunomodulación a través de la interacción del sistema inmune innato y adquirido. Los componentes que integran este sistema e inmunomodulación son los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), las células T, las células B productoras de IgA, los macrófagos y las células dendríticas de la lámina propia (Jandhyala, et al. 2015).

Para persistir en el intestino, las bacterias no patógenas que se asocian íntimamente con el huésped deben ser toleradas por el sistema inmunológico. Por ejemplo uno de los microorganismos que mejor se conoce su inmunomodulación es *B. fragilis*, gracias a un componente de su cápsula (polisacárido A) el cual señala a través de un intermediario celular presentador de antígenos para estimular la producción de IL-10 antiinflamatoria por las células T reguladoras (Donaldson, et al 2016). Por otro lado, las bacterias filamentosas segmentadas (SFB) se intercalan entre las microvellosidades de las células epiteliales y estimulan el desarrollo de células T helper (TH17) 17, que son importantes para la inmunidad de la mucosa a los patógenos extracelulares (Donaldson, et al 2016). Además, varios factores inespecíficos como los AGCC (butirato, propionato etc) promueven el desarrollo de células T.

Factores que determinan el cáncer colorrectal (CRC)

El cáncer colorrectal (CRC) es una de las neoplasias más prevalentes en nuestro medio, ocupando el tercer lugar en orden de frecuencia en varones y el segundo en mujeres. Puede localizarse en todo el intestino grueso (incluyendo ciego, colon ascendente, transversal, descendente, sigma y recto) sin incluir el ano. El patrón histológico más frecuente (> 90%) es de tipo adenocarcinoma, otros subtipos menos frecuentes son los carcinomas adenoescamoso, carcinoma indiferenciado y de células fusiformes (Keum and Giovannucci 2019).

La incidencia del CRC varía con el tiempo y varios factores ambientales así como los específicos del individuo están asociados a la progresión hacia el CRC (Nistal et al. 2015) (Fig. 4). Además, la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en protooncogenes, genes supresores de tumores, y/o los genes de reparación del ADN, conducen a la transformación del epitelio normal en células tumorales (Saus et al. 2019).

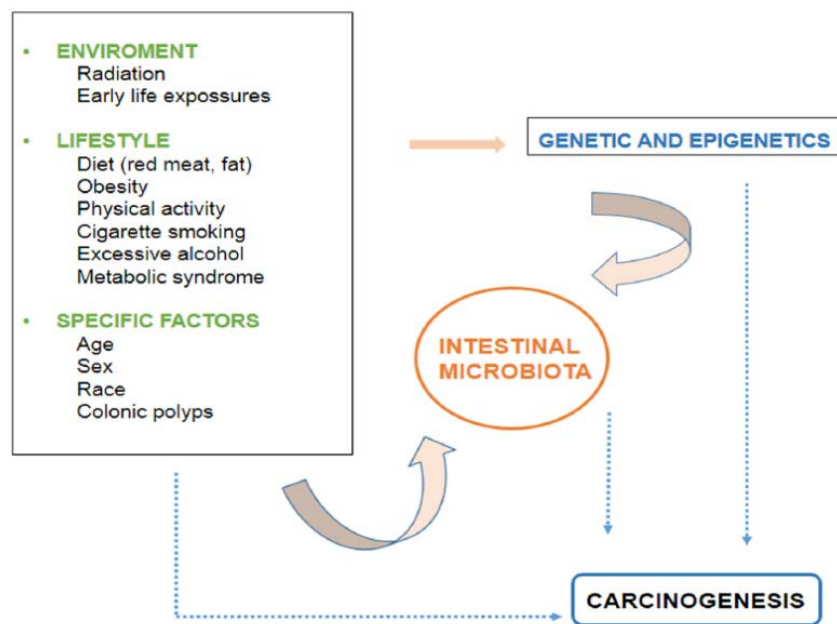


Figura 4. Factores implicados en el desarrollo del CCR. (Adaptado de Nistal et al. 2015)

En cuanto a su origen el CCR, se estima que en torno al 25% de los casos se producen de manera hereditaria, teniendo los pacientes afectos gran componente de carga familiar; sin embargo de estos, solo entre un 5-6% se deben a alteraciones genéticas de alta penetrancia dando lugar a síndromes como la poliposis adenomatosa familiar (PAF), el síndrome de Lynch etc. Por otra parte el 75% de los casos de CRC no son hereditarios, se producen de manera espontánea debido a una predisposición genética con mutaciones genéticas adquiridas combinadas con la interacción de factores ambientales (cabe destacar que los CRC con cualquier componente hereditario no son totalmente hereditarios, ya que dichos factores externos también contribuyen a la carcinogénesis). Por ende es importante resaltar el gran impacto que causan dichos factores ambientales o externos en la patología del CRC siendo un gran objetivo en las principales líneas de investigación de dicha patología (Keum y Giovannucci 2019).

Abarcando en profundidad el marco de la genética, la carcinogénesis colorrectal abarca tres grandes aberraciones genéticas y epigenéticas: la inestabilidad

cromosómica (CIN), el fenotipo metilador de islotes CpG o CIMP (*CpG island methylator phenotype*) y la inestabilidad de microsatélites (MSI) (Keum and Giovannucci 2019). Aproximadamente el 85% de los cánceres colorrectales esporádicos se producen por la vía de la inestabilidad cromosómica (CIN). Este patrón puede resultar de una activación de oncogenes o de una disminución de la actividad de los genes supresores de tumores o de las vías de apoptosis. Esta vía incluye mutaciones de genes claves para la homeostasis epitelial tales como el gen *APC*, *K-ras*, *p53* etc. Por otra parte el CIMP refiere la hipermetilación en dinucleótidos CG repetitivos (conocidas como las islas CpG) en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores que silencian la expresión génica de estos. Por último la MSI se caracteriza por alteraciones en la longitud de los microsatélites (repeticiones cortas de nucleótidos en tándem a lo largo de todo el genoma) provocada por la pérdida funcional de los genes de reparación del ADN, siendo la hipermetilación el principal mecanismo patogénico en el silenciamiento de dichos genes (Keum and Giovannucci 2019).

Cabe resaltar que los fenotipos moleculares mencionados anteriormente no se excluyen mutuamente, sino que tanto la MSI y la CIMP están íntegramente relacionados entre sí ya que comparten el mecanismo de la hipermetilación como inhibidor de la expresión de genes (aproximadamente en un 70% de los CRC con un CIMP alto también encontramos un MSI alto). Así, durante la carcinogénesis, estas alteraciones moleculares se acumulan de forma progresiva observándose un CIN positivo, un CIMP elevado y MSI alto en aproximadamente el 85%, 20% y 15% de los CRC esporádicos respectivamente (Keum and Giovannucci 2019).

Por otra parte, teniendo en cuenta las principales aberraciones genéticas mencionadas, se pueden encontrar 3 vías diferentes en la génesis del CCR: secuencia adenoma-carcinoma, vía serrada y vía inflamatoria (Fig. 5). La secuencia adenoma-carcinoma representa a la mayoría de los CCR esporádicos. Las células epiteliales progresan de pequeños adenomas, incrementando su tamaño progresivamente hasta el desarrollo del cáncer. Así, esta vía se asocia predominantemente con la inestabilidad cromosómica (CIN). La vía serrada representa alrededor del 10-15% del CCR esporádico, este modelo representa la progresión de células epiteliales normales a pólipos hiperplásicos, adenomas dentados y sésiles los cuales acaban derivando en CCR. El fenotipo metilador de islotes CpG se asocia preferentemente con esta vía. Por último la vía inflamatoria es característica de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), predominantemente la colitis ulcerosa (CU). En ella la carcinogénesis progresa de la ausencia de displasia, a displasia de bajo grado, displasia de alto grado y finalmente CCR (Keum y Giovannucci 2019). Esta progresión hacia el CCR varía en función del grado de afectación de la enfermedad hacia la mucosa colónica siendo máxima en la pancolitis (afectación de todo el colon). Debido a la baja incidencia de las EII y que en la mayoría de los casos ya sea por brotes que no responden a terapia inmunosupresora o por una mala evolución de la enfermedad se acaba optando por una colectomía profiláctica, esta vía explica alrededor del 2% de los CCR (Keum y and Giovannucci 2019).

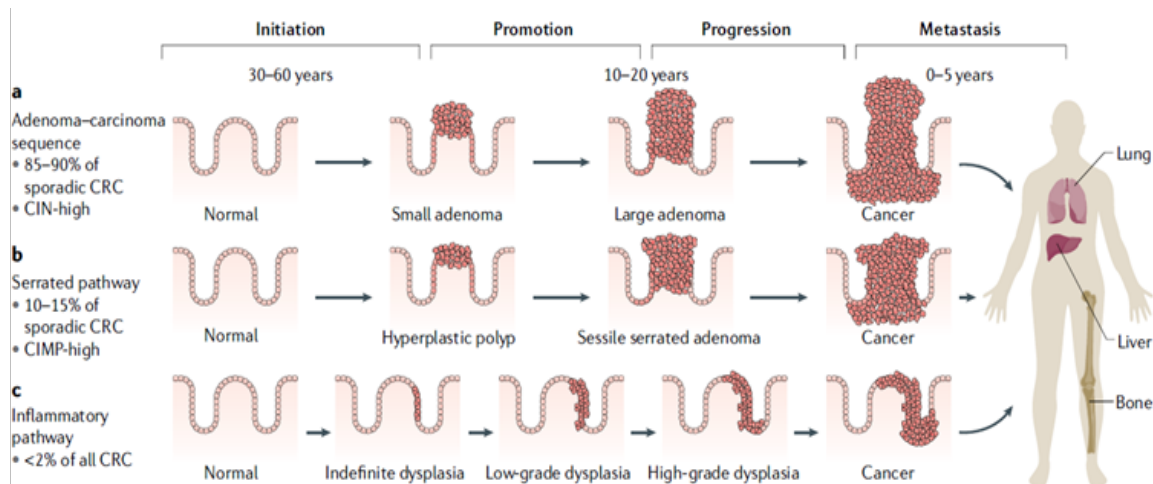


Figura 5. Vías de la carcinogénesis colorrectal. (Adaptado de (Keum and Giovannucci 2019).

Papel de la dieta y el estilo de vida en el cáncer colorrectal

Anteriormente se ha mencionado el proceso fisiopatológico del CCR donde los factores ambientales ejercen un papel fundamental en su patogenia. Entre ellos la dieta y el estilo de vida, se han alzado en los últimos años como unos de los determinantes con mayor peso.

La tendencia de la sociedad hacia la práctica de una baja actividad física sumado a una dieta incorrecta (basada en alimentos ultraprocesados ricos en azúcares añadidos, grasas trans y con un consumo deficitario en proteína) lleva a un incipiente aumento de la obesidad, la cual se conoce como factor de riesgo establecido para el CCR. De hecho ciertos estudios indican que con cada aumento de 5kg/m^2 se asocia con un aumento de 5% del riesgo de CCR (Cheng et al. 2020).

Al igual que en la obesidad y diversos trastornos metabólicos, la inflamación sistémica se reconoce como una característica que permite e impulsa el desarrollo del cáncer, proporcionando múltiples factores que favorecen la génesis tumoral (factores de crecimiento, proangiogénicos, especies reactivas del oxígeno (ROS)...) (Cani and Jordan 2018). De esta forma un aumento del tejido adiposo tanto visceral como subcutáneo conlleva a un aumento de la síntesis de adipocinas proinflamatorias estableciendo una inflamación sistémica crónica y un aumento de resistencia a la insulina. Se sabe que en un contexto de ambiente inflamatorio se promueve el desarrollo en fisiopatología tumoral como ya se ha visto en determinadas patologías como la colitis ulcerosa (CU); sin embargo no se sabe si dicha inflamación relacionada con la obesidad aumenta el riesgo de CCR de forma directa o indirecta a través de procesos como la resistencia a la insulina (Keum and Giovannucci 2019).

Correlacionado con la obesidad, es característico que sujetos con un porcentaje de grasa elevado (debido en su gran mayoría por un superávit calórico mantenido en el tiempo) lleven a cabo un estilo de vida poco saludable asociado a una alimentación basada en ultraprocesados y en una actividad física baja o nula. De hecho se considera al CCR como uno de los pocos tipos de cáncer en los que la falta de actividad física se

reconoce como factor de riesgo; de tal forma que un aumento de la cantidad de ejercicio (independientemente del tipo de entrenamiento) en 5 MET (equivalente metabólico de tarea)–horas por semana se asoció con una reducción de aproximadamente de un 8% del riesgo de cáncer de colon (Keum and Giovannucci 2019). El ejercicio físico enfocado al entrenamiento de fuerza lleva a un cambio en la composición corporal caracterizado por un aumento de la masa muscular y pérdida de tejido graso, siendo esto pieza angular en los beneficios que aporta. Un aumento de la masa muscular reduce en gran medida la inflamación, entre otros motivos debido a una disminución de la resistencia a la insulina típica de sujetos con sobrepeso. Por tanto, queda evidente que una de las mejores pautas preventivas en el abordaje del CCR es el mantenimiento de una actividad física constante basada tanto en el ejercicio aeróbico como en el entrenamiento de fuerza.

Por otra parte ya en los años 80 se predijo que en torno al 90% de los cánceres gastrointestinales se deben a diferencias en la dieta, en la actualidad y gracias a estudios recientes, se ha visto que más de un tercio de los casos de CCR estaban relacionados con dietas compuestas por un patrón alimentario bajo en cereales integrales, en productos lácteos y con predominio alto en carnes rojas y procesadas, gracias a en parte por la modulación de la composición y la diversidad del microbioma intestinal (Cheng et al. 2020). Sin embargo los mecanismos biológicos en los que la dieta influye son probablemente multifactoriales, reflejando así una compleja interacción de diversos componentes, no quedando solo relegado al cambio de la composición de la microbiota (Keum and Giovannucci 2019). Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, dietas con alto contenido en proteínas y grasas animal da lugar a un fenotipo característico dominados por *Bacteriodes* mientras que dietas con altos contenidos en hidratos de carbono producen enterotipos dominados por *Prevotella* (Cheng et al. 2020). Así una alimentación variada y saludable rica en frutas, verduras, cereales, pescados y carnes de calidad se asocia con una disminución del riesgo del CCR; en cambio una dieta basada en cereales refinados, azúcar y grasas saturadas se asocia con un mayor riesgo. En concreto diversos estudios afirman que dentro de los alimentos “poco” saludables, las carnes rojas procesadas son las que más riesgo conllevan. Es importante recalcar que la mayor asociación y evidencia se encuentra en dicho grupo, carnes rojas y procesadas, ya que diversos estudios afirman que la carne roja no procesada y de calidad no supone un factor de riesgo *per se* en el CCR. Se postula que la influencia de las carnes rojas y procesadas en el CCR puede ocurrir a través de compuestos carcinógenos como el grupo hemo, compuestos exógenos como el N-nitroso de las carnes procesadas, aminos heterocíclicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos formados cuando la carne se cocina a altas temperaturas etc (Keum and Giovannucci 2019).

Es importante mencionar que existen, además de los mencionados, numerosos determinantes exógenos que influyen en el CCR. Algunos como factores cancerígenos ya conocidos como el alcohol a través de su metabolito acetaldehído o como el tabaco, implicado en varios procesos tumorales de vías respiratorias. Queda por tanto visto el gran impacto clínico de los factores externos en la carcinogénesis del CCR y como un adecuado estilo de vida basado en una alimentación variada y ejercicio es una de las principales armas de prevención respecto a este.

El consumo de alimentos que contienen un alto contenido en fibra dietética y granos enteros se ha asociado a un riesgo inverso de CCR. Los sustratos fermentables derivados de la fibra dietética pueden promover la diversidad microbiana y el efecto protector de los alimentos que contienen fibra se ha relacionado con la producción bacteriana de ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato (Murphy et al. 2019).

El microbioma intestinal suele responder a intervenciones dietéticas a corto plazo. Sin embargo, tales intervenciones tienden a afectar transitoriamente al microbioma intestinal y por lo general no se mantienen tras el regreso a la dieta a largo plazo. Por esta razón, es poco probable que estas intervenciones tengan éxito en la remodelación del microbioma de manera estable, como se sabe que sucede con la pérdida de peso para la prevención del CCR. La dieta probablemente tiene un efecto mucho mayor en la producción de metabolitos que en la abundancia relativa de bacterias específicas (Fig.6). Por ejemplo, las cepas de *Escherichia coli* que contienen una isla de patogenicidad *pks*, *Fusobacterium nucleatum* y *Providencia* están sobrerrepresentadas en los casos de CCR, mientras que el *Lactobacillus* y las bacterias productoras de butirato como *Roseburia* y *Fecalibacterium* están subrepresentadas (Tilg et al. 2018).

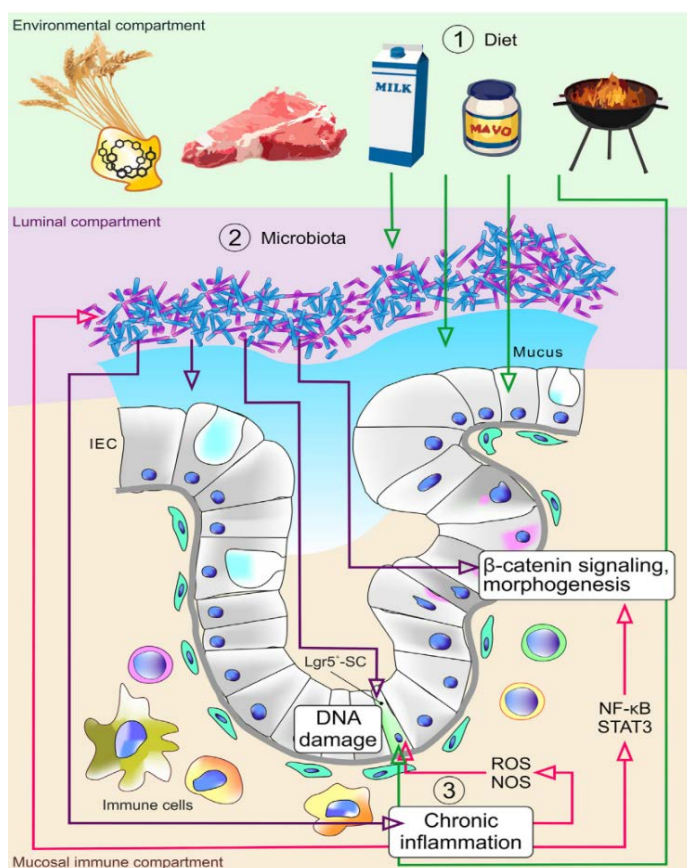


Figura 6. Factores nutricionales implicados en el desarrollo del CCR. (Adaptado de (Tilg et al. 2018). 1). Factores nutricionales externos pueden dañar el DNA, modular la composición de la microbiota intestinal e interferir con las funciones de barrera del intestino. 2). La microbiota intestinal puede inducir daños en el DNA y progresión a tumorogénesis. 3) La inflamación crónica es un factor intrínseco muy importante que promueve la carcinogénesis debido a daños en el DNA y la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

Microbiota intestinal asociada al cáncer colorrectal

En la actualidad muchos estudios se centran en el papel de la microbiota intestinal en la patogénesis del CCR analizando si los microorganismos desempeñan un papel directo o indirecto en su desarrollo (Cani and Jordan, 2018). Cuando se producen alteraciones en la composición de la microbiota colónica se produce un aumento de la vulnerabilidad del intestino con efectos desfavorables para el individuo; a esta alteración del ecosistema de la microbiota se le conoce como “disbiosis” la cual es pieza clave en la iniciación de los procesos tumorigénicos (Koliarakis et al. 2019a).

Para determinar las alteraciones de la microbiota en pacientes con CCR, la mayoría de los estudios se han centrado en un enfoque metagenómico con el fin de conocer las comunidades microbianas que colonizan los tumores, así como zonas no tumorales y caracterizar globalmente el microbioma oncogénico individualizado de cada paciente (Cheng et al 2020). El desarrollo del CCR se relacionó inicialmente con bacterias individuales como *H. pylori*, *S. gallolyticus* y *E. coli*. Sin embargo, el concepto de disbiosis apunta a la implicación de numerosos microorganismos en el CCR (Koliarakis et al. 2019a). En este contexto se ha visto que *S. bovis* es un factor de riesgo en el CCR, además de especies como *Bacterioides fragilis* enterotoxigénico (ETBF) que a través de la producción de toxinas pueden provocar diarrea y se relaciona con enfermedades inflamatorias intestinales (Y. Cheng, Ling, y Li 2020a). Por otra parte la especie *Fusobacterium nucleatum* se ha visto un aumento de su número en adenomas colorrectales, relacionándose con la progresión de adenoma a cáncer y asociando su presencia en los CCR con peor pronóstico (Cheng et al. 2020). Algunos estudios indicaron que la presencia de *Enterococcus faecalis* era significativamente mayor en los pacientes con CCR que en los controles sanos, el mecanismo implicado en dicha correlación se debe a la producción de superóxido, el cual daña el ADN de las células epiteliales. Algunos microorganismos como *Peptostreptococcus anaerobius* y *E. coli* también se encontraban en niveles más altos de colonización en la mucosa colónica de pacientes con CCR; queda reflejado por ende que no es solo un microorganismo implicado en la patogénesis del CCR, sino un conjunto de bacterias cuyas acciones perjudiciales superan a las beneficiosas por parte de la flora comensal (Cheng et al. 2020).

Además algunos microorganismos que se consideran como probióticos están muy reducidos en pacientes con CCR, por ejemplo *Bifidobacterium*, *Roseburia* o *C. butyricum*, los cuales se relacionan en la síntesis de butirato (Koliarakis et al. 2019) o *S. thermophilus* cuya acción fundamental es la síntesis de lactato (Cheng et al. 2020).

Por otra parte, para comprender mejor la relación entre la microbiota y el CCR, los investigadores plantearon una serie de hipótesis. En primer lugar se planteó la hipótesis de las bacterias “ α -bugs” bacterias pro-oncogénicas con determinantes de virulencia únicos de tal forma que una sola bacteria puede involucrar el cáncer de colon tal como *Bacterioides fragilis* enterotoxigénico (ETBF). De esta forma, las bacterias alfa serían las principales responsables de la microbiota en la carcinogénesis del CCR; sin embargo no solo inducen tumores, sino que además remodelan la comunidad bacteriana provocando disbiosis desplazando selectivamente las bacterias intestinales que se consideran como protectoras ante el CCR (Y. Cheng, Ling, y Li

2020a). Entre los posibles candidatos de bacterias alfa tenemos además del ETBF, *S. bovis*, *E. coli* y *E. faecalis* productor de superóxido (Cheng et al. 2020).

Por otro lado también se ha propuesto un modelo dinámico de interacción entre los miembros de la microbiota, exponiendo la hipótesis del modelo “*driver-passenger*” (Koliarakis et al. 2019a). Este modelo sugiere que especies bacterianas específicas con propiedades pro-tumorigénicas (*drivers* o conductoras) desencadenan el desarrollo del CCR al inducir daños sobre el ADN de las células epiteliales de la mucosa colónica. Posteriormente, la alteración del microambiente intestinal conduce a una disminución de las bacterias beneficiosas y a la colonización de la mucosa por patógenos oportunistas (pasajeros) (Koliarakis et al. 2019a). Los conductores, además de su papel en el daño al ADN, también participan en la proliferación del epitelio y en la apoptosis (Koliarakis et al. 2019a). Así el modelo *driver-passenger* destaca que, aunque las bacterias conductoras inician el CCR, estas bacterias no estarán presentes siempre y serán sustituidas por bacterias *passenger* (Y. Cheng, Ling, y Li 2020a) mientras que la hipótesis de las “*α-bugs*” postula que dichos microorganismos colonizan persistentemente los tumores en desarrollo siendo pieza clave en la carcinógenesis (Cheng et al. 2020).

La carcinogénesis colorrectal es un proceso muy complejo en el que están involucrados tanto factores genéticos como ambientales. Así encontramos que la inflamación, la presencia de bacterias patógenas, genotoxinas, stress oxidativo, metabolitos y también biofilms están muy ligados a la microbiota intestinal (Fig.7).

(inmunorreceptores de células T con dominios Ig e ITIM) a través de otra adhesina, Fap2 promoviendo así la secreción de citocinas proinflamatorias (Garrett, 2019). Todo ello crea una inflamación que deteriora el ADN, promueve la proliferación tumoral y da lugar a la tumorigénesis del CCR. Por último un elemento clave en la tumorigénesis del CCR es la activación de la vía NF- κ B y MyD88 a través de la interacción del LPS con los TLRs. Esta interacción conduce a la reducción de la actividad de las caspasas y al aumento de la autofagia (proceso de reciclado celular y que afecta a la supervivencia celular) que lleva a un incremento de la apoptosis (Koliarakis et al. 2019). Además, Fap2 se puede unir al disacárido Gal-GalNac (galactosa-N-acetil-D-galactosamina), altamente expresado en la superficie de muchos tumores y facilita la unión del *F. nucleatum* a las células del CRC (Garrett, 2019).

Numerosos estudios de los últimos años han observado un incremento de *F. nucleatum* en pacientes con CCR en comparación con el tejido adyacente sano, curiosamente se observó que dentro de los pacientes con CCR, los que tenían un nivel más bajo de *F. nucleatum* tenían un mayor tiempo de supervivencia en comparación a los pacientes con niveles altos los cuales además se asociaban a un peor pronóstico y un mayor aumento de la progresión de la enfermedad en la secuencia adenoma-cáncer (Koliarakis et al. 2019).

Por otra parte los mecanismos por los que *F. nucleatum* afecta a la carcinogénesis del CCR también se extienden a facilitar las resistencias a tratamientos de la enfermedad tales como la quimioterapia (Garrett, 2019). Se ha visto que los tumores de pacientes con altas cargas de *F. nucleatum* son más resistentes a la quimioterapia con oxiplatino (agente alquilante que previene la replicación y la transcripción del ADN en células tumorales), gracias a la regulación de vías de señalización de la inmunidad innata (receptor toll-like 4 y MyD88), micro-ARNs específicos y autofagia favoreciendo así, la resistencia a la quimioterapia en el CCR (Koliarakis et al. 2019).

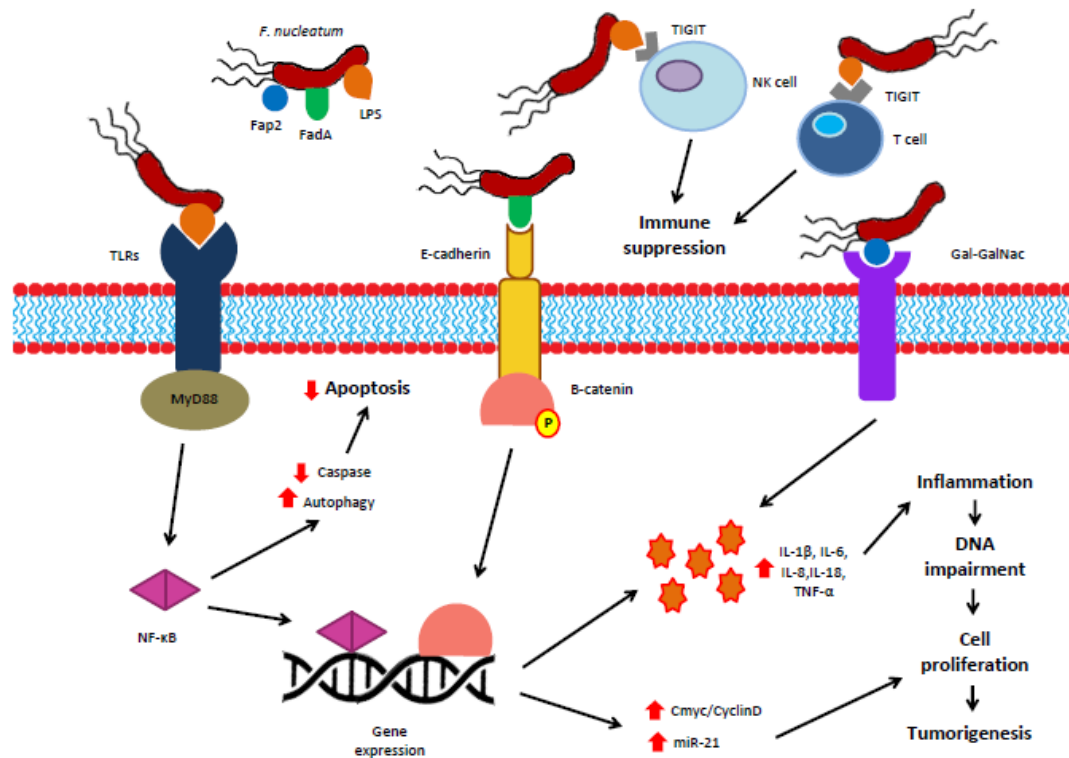


Figura 8. Resumen esquemático de las vías moleculares de *F. nucleatum* en la tumorigénesis del CCR. *F. nucleatum* media sus propiedades oncogénicas a través de tres componentes principales: las moléculas Fap2 y FadA junto con el LPS. El LPS puede interactuar con los TLRs (concretamente TLR2 o TLR4), activando la vía MyD88 y NF-κB. Esta interacción conduce a la reducción de la actividad de las caspasas y al aumento de la autofagia, lo que da lugar a una reducción de la apoptosis. Además, FadA se une a E-cadherina, provocando la desfosforilación y activación de β-catenina. El NF-κB y la β-catenina alteran la expresión génica, aumentando la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18, TNF-α) y regulando al alza las vías oncogénicas de Cmyc/CyclinD y del micro RNA 21 (miR-21). El estado proinflamatorio se ve reforzado por la unión de Fap2 a Gal-GalNac. Además, la interacción del LPS con el receptor TIGIT de las células NK y T conduce a la supresión de la inmunidad antitumoral. Finalmente, estos acontecimientos crean una inflamación que deteriora el ADN, promueve la proliferación celular y da lugar a la tumorigénesis del CCR. (Adaptado de Koliarakis et al. 2019).

Bacteroides fragilis enterotoxigénico (ETBF). ETBF es una bacteria gramnegativa anaerobia obligada localizada principalmente en el tracto digestivo actuando como patógeno gastrointestinal donde desde hace años se ha visto su causalidad en la inflamación intestinal y en diversas patologías. De esta forma, tal y como ocurre con *F. nucleatum*, forma parte de los microorganismos más importantes relacionados con el CCR observándose que un aumento considerado de su número se ha asociado con un curso más agresivo y de peor pronóstico (Villéger et al. 2018).

La fisiopatogenia del ETBF se debe principalmente a la producción de toxinas o metabolitos bacterianos los cuales pueden provocar mutaciones al unirse a receptores específicos de la superficie celular. Estas toxinas pueden afectar a diversos procesos moleculares como la señalización celular y en algunos casos afectar directamente al

genoma, dañando el ADN (Garrett, 2019). De esta forma la ETBF puede colonizar la mucosa de manera asintomática, pero en algunos casos se libera la toxina de *B. fragilis* (BFT) (Nistal et al. 2015).

La BFT es una metaloproteasa dependiente del zinc que altera rápidamente la estructura y función de las células epiteliales del colon, incluyendo la cadherina E y genes supresores de tumores (Nistal et al. 2015). La cadherina E es una molécula de adhesión celular dependiente del calcio con funciones fundamentales en el comportamiento de las células epiteliales; por ende una pérdida de su función aumenta el grado de permeabilidad epitelial en el colon, siendo este uno de los primeros pasos en la fisiopatología tumoral (Villéger et al. 2018).

Por otra parte otra de las vías más importantes de la BFT es la activación del factor de transcripción NF- κ B, al igual que *F. nucleatum* produciendo la liberación de citoquinas inflamatorias, promoviendo así el ambiente proinflamatorio que favorece la aparición del CCR (Nistal et al. 2015).

***Escherichia coli*.** Por último, un microorganismo clave y presente en la patogenia del CCR es una enterobacteria presente en la microbiota gastrointestinal, la *E.coli*.

Analizando muestras de pacientes con CCR se encuentra *E. coli* en la mucosa colónica, que expresan genes *afa*, *ipfA*, *eae* y toxinas que confieren características muy relevantes en la patogénesis donde se incluyen la translocación de células M, angiogénesis y genotoxicidad. En concreto *E. coli* que pertenece a los filogrupos B2 y D comprende la mayoría de las cepas patógenas que expresan factores de virulencia, y algunas de estas especies están involucradas en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, que son factores de riesgo conocidos de CCR (Gagnière et al. 2016).

Dentro de estos filogrupos, el *E. coli* que alberga la isla genómica de policétido sintetasa codifica la producción de la genotoxina del péptido de policétidos, la colibactina. Estas genotoxinas están relacionadas con la carcinogénesis colónica ya que se ha demostrado a través de ciertos estudios que produce daños transitorios en el ADN. De esta forma, la colibactina promueve la senescencia celular, seguido de la producción del factor de crecimiento de los hepatocitos y el aumento de producción de células tumorales (Cheng, et al. 2020). Además esta toxina causa rupturas de doble cadena en el ADN de las células colónicas, impidiendo a los sistemas de reparación restaurar dichas lesiones. Realmente la colibactina se comporta como un agente alquilante, formando aductos del ADN, una forma del ADN altamente mutagénico en las células epiteliales del colon (Fig. 9) de tal forma que las células infectadas con *E. coli* tipo B2 presentaron una frecuencia de mutación alta, demostrando así el potencial mutagénico y transformador de la bacteria (Garrett 2019). De esta forma da lugar a una acumulación de anomalías cromosómicas que favorecen a la tumorigénesis (Nistal et al. 2015).

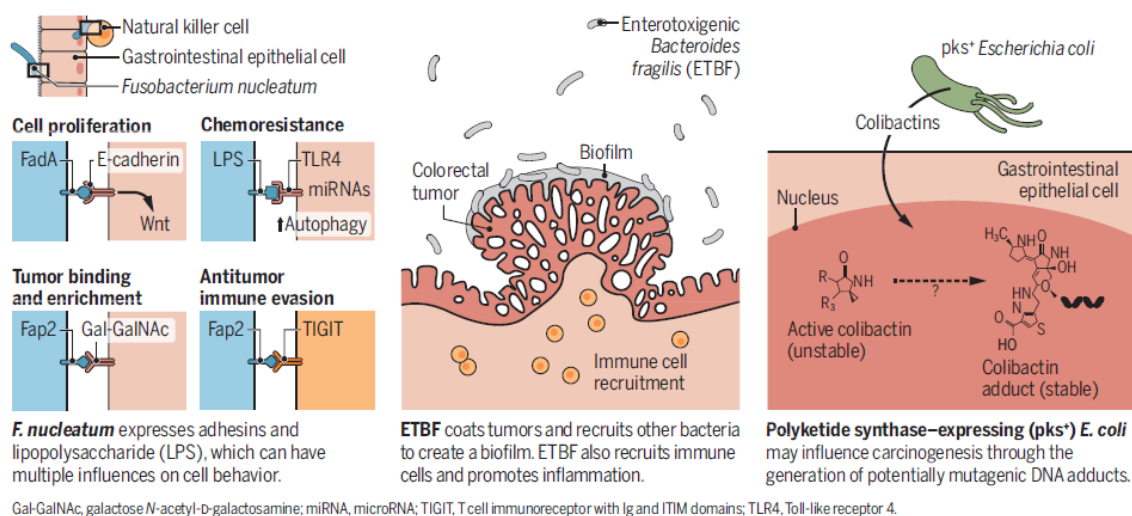


Figura 9. Los microorganismos pueden impulsar el CCR. Tres ejemplos de los posibles mecanismos por los que las bacterias pueden influir en el cáncer CCR. *F. nucleatum* expresa adhesinas y LPS que afectan al comportamiento celular. ETBF recubre tumores y atrae otras bacterias para formar un biofilm. Además, atrae células inmunes provocando inflamación. *E. coli* (pks⁺) genera aductos de DNA potencialmente mutagénicos implicados en la carcinogénesis. No está claro si tienen un papel causal en la carcinogénesis y sus posibles mecanismos implicados (Adaptado de Garrett, 2019).

Todavía no está claro si estas 3 especies son capaces de interactuar en la fisiopatología del CRC y si lo hacen, si es de forma secuencial o lo hacen a la vez. Lo que sí se sabe es que no son las únicas especies relevantes en el CRC por ello son importantes los estudios de microbiota-CRC para observar que microorganismos están presentes en un tumor o si están dentro del tumor o sobre él, o cómo interactúan entre ellos y con el hospedador, que microorganismos llegan al tumor o cuales se van del tumor para configurar así el microambiente del tumor (Garrett, 2019).

Recientemente se llevó a cabo un meta-análisis con metagenomas fecales obtenidos por secuenciación masiva *shotgun* desde 386 pacientes con CRC y 392 controles sin tumores, procedentes de Francia, Austria, Italia, Alemania, USA, China y Japón. Este estudio identificó un conjunto de 29 especies que estaban incrementadas en los metagenomas de CRC (Wirbel et al. 2019). Esas especies pertenecían a los géneros *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Gemella*, *Prevotella*, and *Solobacterium*. Las 29 especies podrían definir un microbioma del CRC y se podían agrupar en 4 grupos relacionadas con la localización del tumor y con el sexo del paciente. El cluster 1 estaba formado exclusivamente de *Porphyromonas*. El 2 contenía especies con prevalencia intermedia en CRC y más abundante en pacientes con CRC del sexo femenino. El 3 incluía especies con la prevalencia más alta en los casos de CRC. El 4 formado exclusivamente por miembros del orden *Clostridiales*, de los que 11 especies eran prácticamente desconocidas hasta la realización del estudio (Fig. 10).

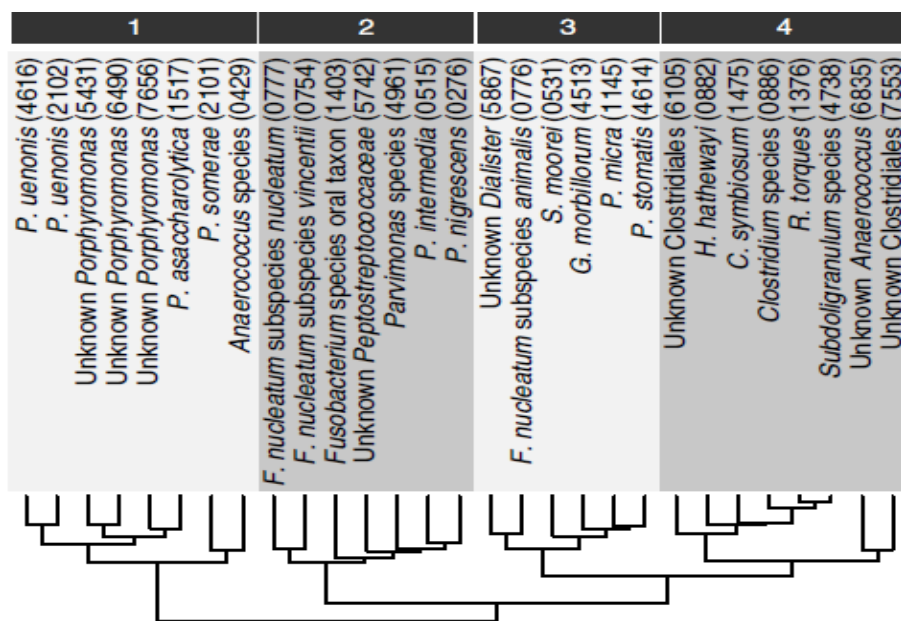


Figura 10. Meta-análisis de metagenomas fecales de pacientes con CRC. Se muestran los 4 grupos de especies de la microbiota intestinal asociadas al CRC. (Adaptado de Wirbel et al. 2019).

Todavía queda por resolver si la fisiopatología observada en el CRC está relacionada con metabolitos producidos por la comunidad oncogénica, o bien es debida a la actividad de ciertas cepas con características genotóxicas (Janney et al. 2020).

Rutas metabólicas enriquecidas en el microbioma de los pacientes con CRC

Se ha descrito anteriormente el fuerte impacto del papel de la microbiota intestinal en el metabolismo y su relevancia en la salud del individuo. Es por ello que a lo largo de los años se han realizado diversos estudios para dilucidar las funciones metabólicas de la microbiota intestinal, enfocado al metaboloma (Villéger et al. 2018). El análisis del metaboloma asociado al CCR ha puesto de manifiesto diversas diferencias respecto a pacientes sanos. De esta forma pacientes con CCR tenían alteraciones en los niveles de AGCC en sus heces y niveles más altos de algunos aminoácidos; así mismo el butirato y bacterias productores de butirato se encontraba disminuidos sus niveles. La ingesta en la dieta de compuestos nitrosos preformados muestra una correlación positiva con el CCR, así se detectaron niveles más altos de ácido sulfhídrico en pacientes con CCR que en pacientes sanos. Además, dietas ricas en grasas estaban asociadas a un incremento en la incidencia del CRC, a un incremento en la secreción de bilis y a un aumento en la concentración de ácidos biliares fecales, de tal forma que concentraciones altas de bilis

en las heces se ha correlacionado con un incremento en la incidencia del CRC (Villéger et al. 2018).

Por otra parte mediante el cribado del metaboloma, se ha descrito la influencia metabólica de las biopelículas microbianas en los tejidos del colon y con ello la aparición del cáncer, lo que sugiere utilizar la metabolómica fecal, no solo con fines de diagnóstico, sino también como una posible herramienta para el tratamiento del CCR (Villéger et al. 2018).

Papel del biofilm en la iniciación del CCR

Entendemos por biofilms como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Este tipo de agregación bacteriana forma parte de la estructura que adquieren las bacterias en diferentes infecciones dentro del cuerpo humano (endocarditis, osteomielitis, periodontitis...) y le confieren un mecanismo de resistencia más efectivo, eludiendo los mecanismos de defensa del huésped. De esta forma dentro de la patogenia de la microbiota intestinal implicada en el CCR parece que tiene un papel relevante la formación de dichos biofilms en relación al origen de la patología.

Analizando y comparando la microbiota intestinal de pacientes sanos y afectados de CCR se vio la presencia de biofilms en la mucosa colónica en aquellos pacientes afectados de la enfermedad. Mediante técnicas de secuenciación masiva se determinó la presencia de variedad de microorganismos incluyendo anaerobios, comensales patógenos (*Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*...) y patógenos orales como *F. nucleatum* donde se hipotetiza que este actúa de microorganismo puente ayudando a la adhesión de otras bacterias (Koliarakis et al. 2019).

La presencia de los biofilms varía a lo largo del colon, siendo predominantes en sectores proximales y de menor abundancia en distales. Otra aplicación recientemente observada es el papel que pueden jugar los biofilms en el riesgo de desarrollar la enfermedad. Diversos estudios afirman que la probabilidad de desarrollar CCR es mayor en personas que poseen biofilms que las que no lo albergan en su colon (Nistal et al. 2015).

La patogenia de los biofilms y su participación en el CCR está mediada principalmente por la alteración de la capa de moco como resultado de la exposición a diversas enzimas bacterianas producto de la colonización bacteriana (glucosidasas, proteasas...) (Koliarakis et al. 2019). La pérdida progresiva de moco a su vez crea un ambiente óptimo para la proliferación bacteriana empeorando paulatinamente la situación. Conforme las bacterias que conforman el biofilm contactan con la capa interna de la mucosa, que en condiciones normales no alberga ningún microorganismo, esta deja de producir sustancias antimicrobianas y glicoproteínas productoras de mucina (MUC2) (Koliarakis et al. 2019). El resultado final es un aumento de la permeabilidad intestinal tras la reducción de la síntesis de la cadherina E y una mayor activación de IL-6 y STAT3, que lleva a un estado proinflamatorio. De esta forma IL-6 y STAT3 promueven

el desarrollo del CCR a través del aumento de la proliferación epitelial (como se observa en la Fig.7) y un aumento de la apoptosis debido al aumento de permeabilidad intestinal y la inflamación tisular pro-carcinogénica (Cheng, et al 2020).

Impacto de la microbiota intestinal en la eficiencia y toxicidad de las terapias contra el CCR

Gracias al crecimiento exponencial de los estudios relativos a la microbiota intestinal, especialmente patente en los últimos años, se ha observado que ésta ejerce un papel central en la etiología y la patogénesis del CCR, abarcando gran parte de las esferas que conforma la patología. Así mismo y gracias a dichas investigaciones, se ha dado un paso más sobre la implicación de los microorganismos intestinales en relación al tratamiento y el pronóstico de la enfermedad a través del impacto en la eficiencia y la toxicidad de las terapias curativas.

De esta forma la disbiosis intestinal no sólo está implicada en la tumorigénesis, sino también en la eficacia del tratamiento. La capacidad metabólica de la microbiota colónica para regular la respuesta inflamatoria y la inmunidad del huésped se correlaciona fuertemente con el resultado terapéutico afectando en la modulación de la eficacia de las diversas terapias curativas (quimioterapia, radioterapia, cirugía...) (Koliarakis et al. 2019). Por otra parte, la microbiota intestinal puede contrarrestar los efectos anticancerígenos de algunos agentes quimioterapéuticos, entre ellos el 5-fluorouracilo, la ciclofosfamida, la gemcitabina o el oxaliplatino (Wong and Yu 2019).

Quimioterapia: La microbiota intestinal parece estar implicada en la eficacia de la quimioterapia a través de numerosos mecanismos como el xenometabolismo, interacciones inmunitarias y alteraciones en la composición de la propia microbiota (Villéger et al. 2019). De esta forma varias especies implicadas en la patogenia del CCR muestran mecanismos de resistencia a agentes quimioterapéuticos. Se comentó anteriormente que pacientes con altas cargas de *F. nucleatum* son más resistentes a la quimioterapia con oxiplatino o fluorouracilo (5-FU) gracias a la regularización de la autofagia y diversas vías de señalización (TLR4/MyD88), dotándolos de un peor pronóstico de la enfermedad.

Por otra parte diversos estudios concluyen que *Bacteroides spp* contribuye a un aumento de la toxicidad en la quimioterapia de pacientes afectos de CCR. El mecanismo se realiza debido a una elevada actividad de conversión de sorivudina en un intermediario (bromovinyluracil o BVU), que inhibe la degradación de 5-FU dando lugar a una acumulación de este quimioterápico en sangre y por tanto aumentando su toxicidad (Villéger et al. 2019). De este modo, los perfiles metabolómicos y los metagenómicos de la microbiota intestinal podrían ser de gran utilidad antes de elegir un determinado fármaco en el tratamiento del paciente. Por ejemplo el irinotecán (quimioterapéutico utilizado en el CCR diseminado) causa diversos efectos adversos limitantes de la dosis los cuales están influenciados por la β -glucuronidasa bacteriana (Villéger et al. 2018).

Inmunoterapia: Una de las diversas funciones de la microbiota intestinal es el papel que juega en la inmunidad del individuo, lo que deriva que la inmunoterapia desempeñe un papel indispensable en la respuesta al tratamiento en pacientes afectados de patologías tumorales. Diversos estudios realizados en diversos pacientes mostraron que la administración oral de probióticos como *Bifidobacterium spp* y *Akkermansia muciniphila*, mejoró sustancialmente la inmunoterapia basada en PD1 (receptor de muerte programada) aboliendo significativamente el crecimiento del tumor (Fig. 11). Sin embargo, estos estudios no emplearon modelos de pacientes afectados de CCR lo que hace que las conclusiones no lleguen a ser definitivas (Fong et al. 2020).

Por otra parte, en pacientes con tratamiento antibiótico, se ha observado una pérdida de la eficacia de la inmunoterapia. Esto se debe a una disminución de la carga de la microbiota intestinal, que deriva en la disminución de los monocitos productores de citoquinas proinflamatorias en el tumor (Villéger et al. 2019). En adición el tratamiento con antibióticos, también se ha visto que influye en la respuesta de los anticuerpos al CTLA-4 (antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos). Estudios en ratones comprobaron que los grupos sometidos a tratamiento antibiótico no respondían adecuadamente a la terapia con anti-CTLA-4; de esta forma se vio que microorganismos como *Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. fragilis* y *Burkholderia cepacia* se asociaban con una respuesta más eficaz anti-CTLA-4 y con menos efectos secundarios (Koliarakis et al. 2019).

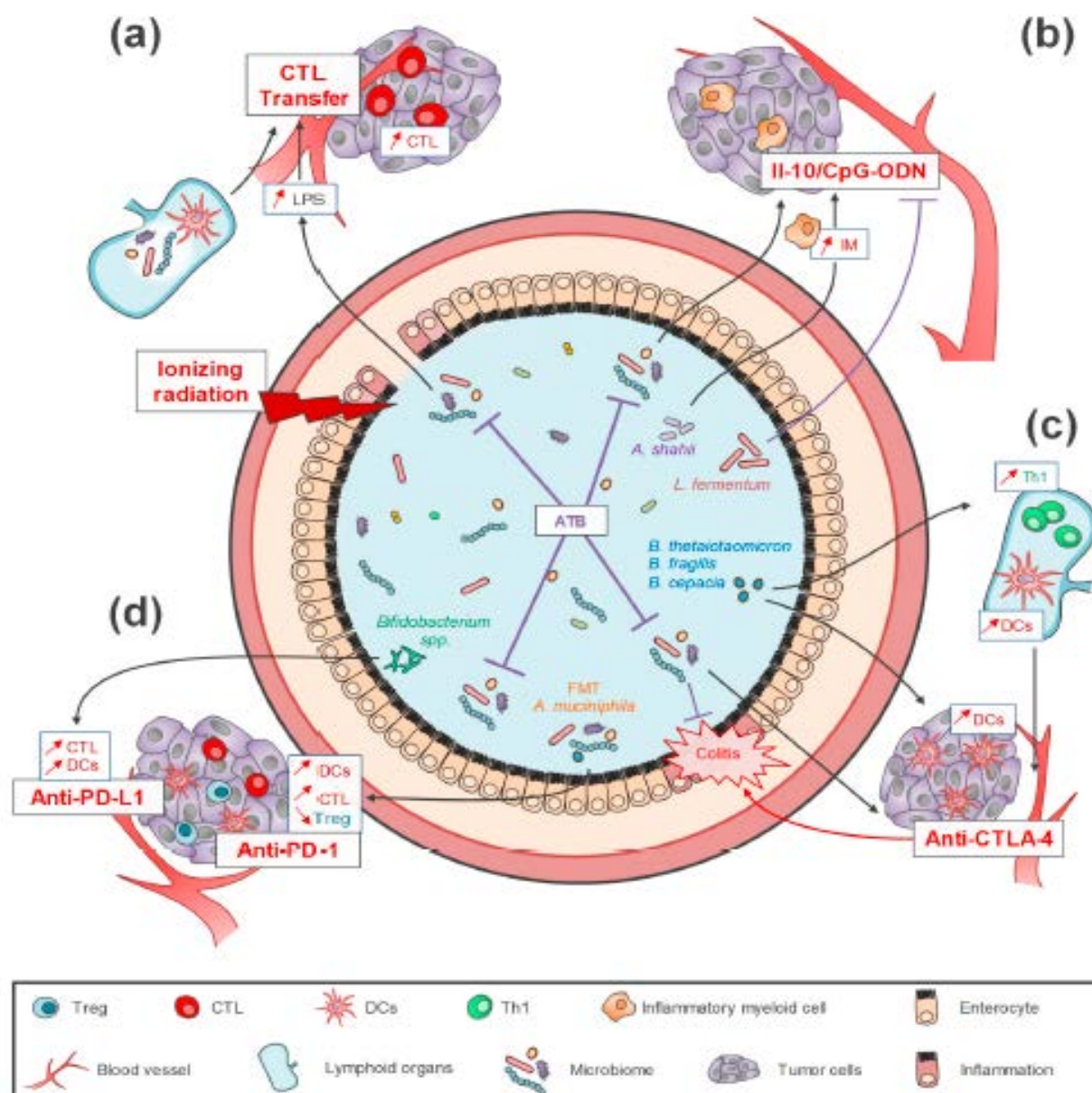


Figura 11. Impactos de la microbiota intestinal en la eficacia y la toxicidad de las estrategias de inmunoterapia.

(a) La eficacia de la transferencia adoptiva de células T CD8+ antitumorales (CTL) es estimulada por la translocación de las bacterias intestinales al ganglio linfático mesentérico y el aumento de la concentración sistémica de LPS inducido por la irradiación corporal total en el modelo murino. Esta estimulación se ha asociado a un aumento del reclutamiento de CTL en el microambiente tumoral. (b) Una disminución de la carga bacteriana intestinal después de la terapia con antibióticos (ATB) perjudicaría la eficacia de la inmunoterapia con oligodeoxinucleótidos (ODN) anti-IL-10/CpG debido a la disminución de las células mieloides productoras de citoquinas proinflamatorias. Del mismo modo, se ha demostrado el papel negativo de *Lactobacillus fermentum*, sin embargo *A. shahii* podría aumentar las células mieloides intratumorales y aumentar la eficacia de la ODN (c,d) El impacto de la microbiota intestinal en la eficacia de los inhibidores de los checkpoints (puntos de control inmunológicos) y la toxicidad a través de la modulación de las células linfoides y mieloides remotas. (c) *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis* y *Burkholderia cepacia* se asociaron con un aumento de las células Th1 y de células dendríticas (DCs) en los órganos linfoides, lo que lleva a un aumento de la respuesta anti-CTLA-4. Esta respuesta inmunitaria mediada por la microbiota también podría estar respaldada por

el reclutamiento de DCs maduras en el microambiente del tumor. Además, la presencia de estas bacterias específicas podría estar asociada a una disminución de los efectos secundarios del anti-TCLA-4. (d) *Bifidobacterium spp.* se relacionó con respuesta anti-PD-L1 eficaz debido a la elevación de CTL y células dendríticas intratumorales. El trasplante de microbiota fecal (FMT) desde pacientes a ratones libres de gérmenes (GF) podría activar un mecanismo inmunológico similar y mejorar la respuesta a la terapia anti-PD-1 en tumores sólidos epiteliales. (a,b,c,d). Los tratamientos con antibióticos inducen una disminución de la eficacia antitumoral de todas estas inmunoterapias. (Adaptado de Villéger et al. 2019).

Radioterapia: Uno de los pilares en el tratamiento, no solo del CCR, sino de la gran mayoría de la patología tumoral es la radioterapia. Sin embargo la respuesta del tumor al tratamiento radioterápico es muy heterogéneo y su causa no está clara; sin embargo estudios recientes han sugerido que la respuesta tumoral podría verse afectada por la microbiota intestinal (Villéger et al. 2019). Ensayos realizados en ratones vieron alteraciones en la microbiota intestinal en ratones con menor respuesta a los ciclos de radioterapia, presentando así una menor tasa de supervivencia. Otra hipótesis que se relaciona con la radiorresistencia es la regulación de la autofagia tal y como se estableció en la quimioterapia aunque los mecanismos no parecen estar claros (Villéger et al. 2019.)

En este sentido la microbiota intestinal podría ser un marcador de radiosensibilidad, pero el número escaso de estudios y el desconocimiento del verdadero impacto de la microbiota en dicha terapia hacen que las hipótesis no sean concluyentes y dificulta la identificación de las poblaciones de bacterias radiorresistentes.

Integración de los datos del microbioma en la medicina de precisión para la prevención, diagnóstico y tratamiento del CCR

A raíz de los avances en el conocimiento de la microbiota intestinal y su papel en la patología del CCR, en los últimos años ha surgido una aplicación innovadora a través del uso de biomarcadores, elevando su utilidad y uso como herramienta en la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Definimos biomarcador como aquella sustancia que indica un estado biológico. Esto engloba no sólo la presencia o ausencia de la enfermedad, sino también la posibilidad de valorar la gravedad de la misma. De esta forma gracias a la gran cantidad de datos metagenómicos que se dispone de la microbiota intestinal en las últimas décadas, éstos se pueden utilizar como fuente de potenciales biomarcadores fecales cuyo papel podría ser clave en el objetivo de reducción de la incidencia y mortalidad del CCR gracias a disponer de una prueba específica y no invasiva para el diagnóstico precoz de la enfermedad.

El objetivo en la utilización de los biomarcadores es localizar precozmente aquellos CCR en estadios precoces, cuya supervivencia a los 5 años es del 90%. Comparando la prueba de elección en la actualidad para el diagnóstico precoz del CCR (sangre oculta en heces o el test inmunoquímico fecal, FIT) con la prueba de ADN en heces vemos un aumento de la sensibilidad respecto a esta última (79% vs 92,3%) (Wong and Yu 2019).

En los últimos años se han realizado varios estudios analizando diferentes perfiles del microbioma de pacientes con CCR, entre todos los candidatos bacterianos analizados parece que *F. nucleatum* se alza como biomarcador clave al ser cuantificado solo o combinado con otras bacterias (*Clostridium symbiosum*, *E. coli* productora de colibactina, *Clostridium hathewayi*...) en pacientes afectados de CCR. De esta forma la abundancia fecal de *F. nucleatum* junto con la utilización de FIT puede otorgar una sensibilidad y especificidad mayor en la detección del CCR que usar solamente FIT (Wong and Yu 2019).

Por otra parte se comentó anteriormente que una de las vías patogénicas en la formación del CCR es la secuencia adenoma-carcinoma. Uno de las implicaciones y objetivos de los biomarcadores no solo es diagnosticar *per se* el CCR sino identificar dichos adenomas y evitar su progresión hacia la entidad neoplásica. Abundantes estudios observaron que la combinación de marcadores microbianos como la abundancia de múltiples especies bacterianas junto con datos clínicos podían diferenciar a pacientes con adenomas colorrectales de controles sanos con AUC (área bajo la curva) de 0,9, sugiriendo así la posibilidad de utilizar los datos de biomarcadores para el diagnóstico de adenomas (Wong and Yu 2019). Sin embargo los resultados no fueron concluyentes ya que algunos estudios difieren con estos resultados. Tal y como sucedía con los CCR en estadios precoces, se identificó una presencia mayor de *F. nucleatum* en pacientes con adenomas colorrectales que en controles sanos, demostrándose que la cuantificación de la bacteria en muestras fecales puede diferenciar a pacientes con adenomas de los individuos sanos (Wong and Yu 2019).

En los últimos años diversos estudios han buscado biomarcadores más allá de muestras fecales, en concreto en microorganismos de la cavidad oral que tienen relación conocida con el CCR aunque hay poca evidencia al respecto. El sector de los biomarcadores ofrece un gran abanico de posibilidades otorgando de cara al futuro un fuerte potencial para el diagnóstico precoz del CCR precoz. Así, se ha observado que varios productos metabólicos microbianos están asociados con el CCR, de tal forma que el metaboloma se podría utilizar también para el descubrimiento de biomarcadores. Varios estudios realizados con extractos fecales de pacientes con CCR han encontrado niveles más altos de acetato y más bajos de butirato y del ácido biliar ursodesoxicólico en comparación con los controles sanos. Estos metabolitos podrían servir como "huellas dactilares" para buscar el CRC. Sin embargo se necesitan estudios más amplios para evaluar el papel del perfil del metaboloma para la detección del CCR, incluyendo técnicas de imagen más potentes tales como RMN, cromatografía líquida o espectrometría de masas (Wong and Yu 2019).

Modificación de la microbiota intestinal con fines terapéuticos

Se ha expuesto anteriormente toda la influencia de la microbiota intestinal en el CCR. En los últimos años, gracias al avance y al continuo estudio del área, la microbiota intestinal se ofrece como una alternativa adicional para el tratamiento de ciertas enfermedades. De esta forma el microbioma está surgiendo como parte integral de la medicina de precisión, ya que no sólo contribuye a la variabilidad interindividual en los aspectos de una patología, sino que también representa un factor potencialmente modificable, susceptible de ser utilizado en el tratamiento de las enfermedades.

Centrando este aspecto en el CCR, la modulación de la microbiota intestinal tiene como objetivo revertir la disbiosis microbiana previamente mencionada implicada, en la patogenia de la enfermedad. Se han empleado diferentes estrategias para revertir dicha disbiosis, entre ellas los prebióticos, probióticos y trasplante fecal.

Probióticos: la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos define los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped”. Desde que fueran descritos a principios del siglo XX por el premio Nobel Metchnikoff, se han reconocido diversas funciones adicionales de estos complementando su acción principal de recomposición de la microbiota intestinal.

Varias bacterias, incluidas *Bifidobacterium* y *Lactobacillus spp* han mostrado propiedades anticancerígenas en estudios preclínicos a través de diferentes mecanismos como inhibición de la proliferación celular, modulación de la inmunidad del huésped, inactivación de toxinas cancerígenas etc. (Wong and Yu 2019). Uno de los objetivos en la administración de probióticos es restablecer la disbiosis previamente establecida manteniendo el equilibrio bacteriano. Varios estudios sugieren que la administración de cepas probióticas específicas disminuye la colonización de patógenos como *C. difficile* y *S. aureus* gracias a la adhesión al epitelio colónico, compitiendo con las bacterias patógenas impidiendo su agregación. Al excluir la invasión patógena, la ingesta de probióticos ayuda a reducir los riesgos de infección intestinal y la posterior inflamación, por lo que podría prevenir el desarrollo del CCR (Fong et al. 2020).

La administración de probióticos ejerce un efecto inmunomodulador de las mucosas, suprimiendo en consecuencia la inflamación colónica. Se ha visto que determinadas especies como *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium rhamnosus* son capaces de activar células dendríticas (CD) intestinales (Fig. 12) lo que ayuda a la regulación de células T gracias a la inhibición de STAT3 y NF-κB, reduciendo el ambiente proinflamatorio tras la reducción de síntesis de interleucinas (IL-17, IL-23) (Fong et al. 2020).

Por otra parte y como se mencionó anteriormente un paso clave en la patogénesis del CCR es la disfunción de la barrera intestinal debido a un aumento de la permeabilidad de esta, llevando a una translocación bacteriana. De esta forma se ha demostrado que varias cepas probióticas como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y

E. coli Nissle 1917 mejoran la función de la barrera intestinal modulando la expresión de proteínas de la unión intercelular (occludina, claudina-1) estimulando así la producción de mucina y promoviendo una reducción del ambiente proinflamatorio (Fong et al. 2020).

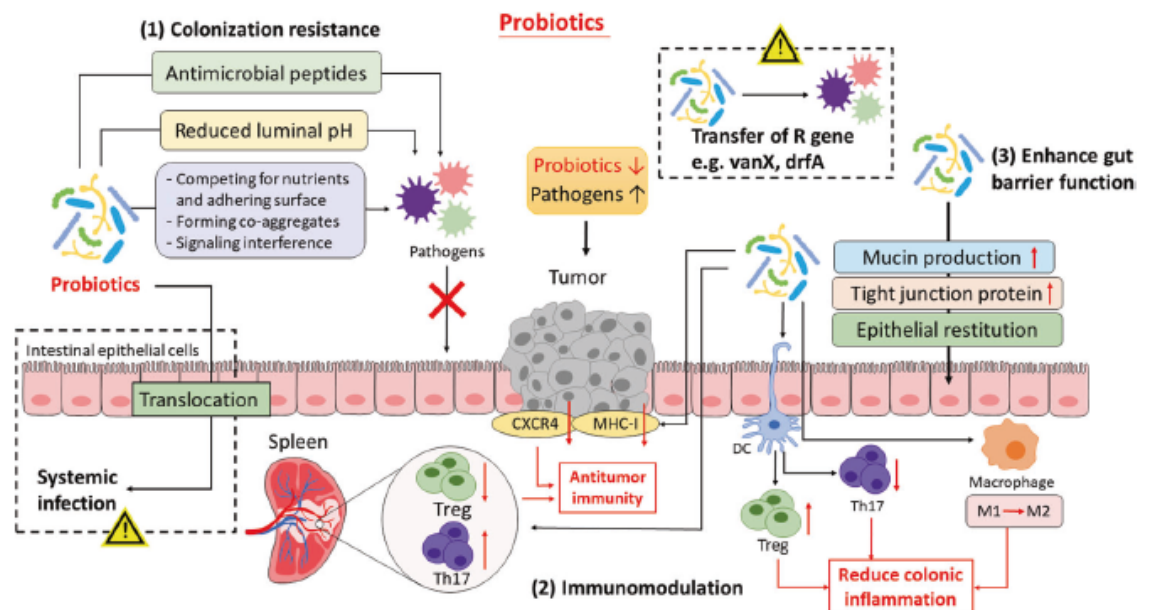


Figura 12. Posibles mecanismos de acción de los probióticos y sus riesgos asociados. Los probióticos pueden estar implicados en la prevención y el tratamiento del CCR por tres mecanismos diferentes: (1) Resistencia a la colonización: Los probióticos inhiben la colonización de bacterias patógenas liberando péptidos antimicrobianos, reduciendo el pH luminal y/o interactuando directamente con los patógenos (por ejemplo, compitiendo por nutrientes y ubicación, formando coagregados). (2) Modulación de la inmunidad: Los probióticos pueden tener un efecto inmunomodulador con el objetivo de reducir la inflamación colónica (por ejemplo, activando células dendríticas, reduciendo los Th17, aumentando la expresión de los Treg y cambiando los macrófagos al subtipo M2) o mejorando la inmunidad antitumoral (aumentando la expresión de Th17 y reduciendo los niveles de Treg a nivel sistémico, reduciendo la expresión de CXCR4 y MHC-1). (3) Mejora de la función de la barrera intestinal: Los probióticos aumentan la producción de mucina y la expresión de la proteína de unión estrecha promoviendo la restitución epitelial. Sin embargo, también hay riesgos en el uso de probióticos en el cáncer (riesgo de translocación bacteriana, invasión sistémica), así como la posible transmisión de genes resistentes a la microbiota residente y el aumento de la resistencia a los antimicrobianos (Adaptado de Fong et al. 2020).

Sin embargo esta información descrita proviene de un número escaso de estudios realizados en humanos. Recientes metaanálisis que evaluaban la eficacia y seguridad de los probióticos en pacientes afectados de cáncer sugieren que puede ser beneficiosos

aunque los mecanismos antitumorales siguen sin estar claros necesitándose más evidencia al (Villéger et al. 2019.)

Por otra parte ciertas investigaciones se centraron no solo en el efecto de los probióticos en la inhibición de la tumorigénesis, sino que abarcaron el potencial de estos en la mejora de la eficacia y reducción de la toxicidad de las terapias contra el cáncer mostrando una correlación positiva a favor del uso de esta terapia. De esta forma diversos estudios afirman que la suplementación con probióticos podría reducir la frecuencia de la diarrea grave y las molestias abdominales en pacientes con CCR que reciben quimioterapia con 5-FU y reparar lesiones intestinales producidas por los ciclos de radioterapia (Fong et al. 2020).

A pesar de todo ello la evidencia directa que respalda el uso de probióticos para la prevención del CCR es preliminar. Un aumento de ensayos clínicos ayudarán a definir mejor la posible utilidad clínica de los probióticos para la profilaxis del CCR enfocando de una forma distinta e innovadora el tratamiento de dicha patología (Wong and Yu 2019).

Prebióticos: Entendemos por prebiótico a un tipo de fibra alimenticia que es utilizada selectivamente por los microorganismos del huésped confiriendo un beneficio para la salud. El uso de prebióticos, también conocidos como fibras dietéticas no digeribles por el huésped y utilizadas por la microbiota intestinal, aumenta la colonización y el número de microorganismos junto con sus metabolitos específicos. De este modo para obtener el efecto beneficioso de estos es necesario la presencia de bacterias beneficiosas en el intestino del huésped. Así, en la práctica clínica los prebióticos se dan en combinación con probióticos, término que en conjunto se conoce como simbióticos (Cheng, et al 2020).

El uso de prebióticos junto con probióticos parece que tiene un efecto beneficioso en pacientes afectados de CCR a través de la producción de metabolitos. Los prebióticos son fermentados selectivamente por los probióticos colónicos dando a lugar a la producción de AGCC incluyendo acetato, butirato y propionato. Niveles altos de butirato sugieren un efecto beneficioso en pacientes afectados de CCR debido a la inducción de la apoptosis de las células tumorales, reducir la inflamación, modular el estrés oxidativo y mejorar la función de la barrera epitelial (Fong et al. 2020). Tal y como sucedía con el uso aislado de probióticos, el uso combinado de prebióticos y probióticos podría considerarse como adyuvante en la terapia del cáncer para mejorar su eficacia. Hay poca evidencia al respecto pero un estudio realizado por investigadores brasileños vieron una reducción en la mortalidad y en las complicaciones postoperatorias en pacientes que recibían simbióticos (Villéger et al. 2019) lo que sugiere el desarrollo de nuevos enfoques para aumentar la eficacia contra el cáncer.

Por otra parte, además de estimular el crecimiento de los probióticos y la producción de metabolitos, los prebióticos pueden actuar de forma independiente ejerciendo un efecto directo en el intestino. Una de las propiedades más estudiadas es la propiedad

antiadhesiva contra los patógenos. Los oligosacáridos prebióticos pueden interactuar con el receptor bacteriano y evitar que los patógenos se adhieran a las células epiteliales inhibiendo su colonización; además se ha visto que ejercen un mecanismo en la regulación de la respuesta inmunitaria gracias al aumentar la producción de IFN- γ e IL-10 en las células T CD4⁺ ((Fong et al. 2020).

Sin embargo hay una característica específica que muestran los prebióticos y es la variabilidad interindividual en la respuesta a estos. Estudios recientes han concluido que las intervenciones prebióticas pueden ejercer efectos variables en diferentes individuos llegando a producir incluso efectos perniciosos para el paciente en algunos casos. No hay evidencia suficiente en este aspecto pero parece que la variabilidad genética juega un papel clave en este proceso y harían falta más estudios para dilucidar el mecanismo fisiológico que subyace.

Trasplante de microbiota fecal: Una de las bioterapias más emergentes y estudiadas de los últimos años es el trasplante de microbiota fecal (TMF). Mediante la administración de trasplantes fecales de donantes sanos al tracto gastrointestinal de pacientes, el TFM introduce población microbiana sana y libre de enfermedades en una comunidad disbiótica, intentando restablecer la homeostasis microbiana. Esta entidad, que cuenta con la mayor evidencia científica en su eficacia clínica, ha sido utilizada en diversas patologías tales como la infección por *C. difficile*, EII, síndrome intestino irritable entre otros. Sin embargo su aplicación en el tratamiento clínico del CCR todavía no ha sido demostrada, existiendo principalmente estudios preclínicos en animales (Cheng, et al 2020).

A pesar de los diferentes éxitos de la bioterapia en las diferentes patologías todavía no se han resuelto numerosas cuestiones sobre el TFM, especialmente en lo que respecta a su perfil de seguridad sugiriendo algunos riesgos potenciales en su uso clínico. Además, todavía no hay consenso en relación a las condiciones óptimas de almacenamiento de las heces, la normalización de los procesos, la selección de donantes y receptores, así como el establecimiento de un ciclo adecuado de administración, dosis y frecuencia del TMF. A corto plazo los posibles efectos adversos del TFM son leves y transitorios tales como diarrea, distensión abdominal o estreñimiento. Sin embargo la controversia se ha originado en los posibles riesgos de transmisión de bacterias multirresistentes y del posterior desarrollo de infecciones potencialmente mortales (Fong et al. 2020). Además se han documentado algunas infecciones posteriores a la bioterapia donde se incluían gastroenteritis por norovirus, bacteriemia por *E. coli*, e infección por citomegalovirus (CMV), aunque en estos casos no se estableció un mecanismo causal a los hechos pudiéndose derivar de infecciones adquiridas del ámbito quirúrgico (Fong et al. 2020).

Queda patente que aunque las aplicaciones de TMF en la infección por *C. difficile* refractaria sean muy efectivas, en la aplicación al CCR existe poca evidencia de estudios realizados en seres humanos requiriendo más datos de apoyo precedentes de ensayos controlados. Sin embargo el potencial clínico de esta bioterapia es amplio, estableciéndose en un futuro como una posible terapia en el tratamiento del CCR.

Una estrategia más directa consistiría en eliminar específicamente las bacterias deletéreas asociadas al CCR. Los antibióticos se han utilizado con éxito para modular el microbioma y afectar indirectamente a la progresión del CCR. Así, la utilización de metronidazol para tratar ratones con xenografías derivadas de pacientes con CRC mostró que reducía tanto la carga de *F. nucleatum* como el crecimiento general del tumor. Sin embargo, el metronidazol también eliminaba a otros anaerobios de la microbiota intestinal de ahí que el uso de antibióticos está muy controvertido y generalmente tiene amplios efectos en la microbiota intestinal, a menudo llevando a la disbiosis y facilitando la adquisición de resistencia a los medicamentos (Fong et al. 2020). Otra estrategia que promete resultados muy esperanzadores es la fagoterapia. Esta ha sido utilizada con éxito para eliminar específicamente *F. nucleatum* en ratones con CRC. Para ello se utilizaron nanopartículas de dextrano que encapsulaban el anticancerígeno irinotecan a las que se unieron covalentemente fagos modificados (aislados de la saliva humana y que lisaban *F. nucleatum*). Cuando estas partículas híbridas fueron administradas por vía intravenosa a ratones con CRC se consiguió potenciar el efecto anticancerígeno del irinotecan además de eliminar eficientemente al *F. nucleatum* y aumentar bacterias beneficiosas productoras de butirato como el *Clostridium butyricum* (Zheng et al. 2019).

Conclusiones

La literatura científica actual refleja una clara implicación de la microbiota intestinal en la patogenia del CCR. Esta relación se ha visto que abarca toda la progresión de la enfermedad. De esta forma en estadios iniciales debido a la formación de biofilms bacterianos, se altera la barrera de moco de las células colónicas favoreciendo a un aumento de la permeabilidad intestinal, con un aumento del ambiente proinflamatorio. Posteriormente la colonización de patógenos oportunistas incrementa el daño local y favorece el ambiente inflamatorio a través de las múltiples vías de patogenia que abarcan desde la síntesis de genotoxinas hasta la disregulación del sistema inmune. No solo los datos obtenidos de la fisiopatogenia de los microorganismos nos ofrecen datos acerca del funcionamiento exacto del CCR, también la presencia *per se* de ciertas cepas se muestran como una posible arma en relación a la valoración del pronóstico de la enfermedad y al diagnóstico precoz de esta. En los últimos años y con el aumento progresivo de la evidencia hacia el mecanismo de la disbiosis, se ha postulado que una modificación en la composición de la microbiota intestinal en pacientes afectados de CCR podría resultar beneficioso. De esta forma surgen diversos tratamientos enfocados al microbioma con el objetivo de mejorar la evolución de la enfermedad, tales como el trasplante de microbiota fecal y el uso de pre/probióticos en la dieta, con el fin de modular la microbiota intestinal para ayudar a la prevención y tratamiento del CCR. Además hay que destacar el hecho de que el microbioma y su metaboloma intestinal están siendo investigados como posibles biomarcadores del CCR.

Todavía hay muchos aspectos a detallar en los procesos mencionados anteriormente, sin embargo queda patente la enorme implicación de la microbiota intestinal, no solo en la enfermedad mencionada, sino en diversas enfermedades sistémicas. De esta forma se abre una nueva forma de entender el origen y la patogenia de determinadas enfermedades, postulando diferentes formas de tratamiento gracias al conocimiento exacto de la enfermedad. Es importante recalcar la necesidad de una continua investigación, tanto preclínica como clínica, para esclarecer con mayor exactitud los vínculos entre la microbiota intestinal y el CCR con el objetivo de mejorar el pronóstico en una de las neoplasias con mayor número de mortalidad en la actualidad.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
CCR	Carcinoma colorrectal
BAL	Bacterias ácido lácticas
OTU	Unidades taxonómicas operativas
HMP	Proyecto Human Microbiome
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ACL	Ácido linoleico conjugado
SFB	Bacterias filamentosas segmentadas
GALT	Tejidos linfoides asociados al intestino
AMP	Proteínas antimicrobianas
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
TLR	Receptores tipo toll
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
CIN	Inestabilidad cromosómica
CIMP	CpG island methylator phenotype
MSI	Inestabilidad de microsatélites

Abreviatura	Significado
ROS	Especies reactivas de oxígeno
CU	Colitis ulcerosa
MET	Equivalente metabólico de tarea
ETBF	<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigénico
IECs	Células epiteliales intestinales
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
TIGIT	Inmunorreceptores de células T con dominios IgE e ITIM
5-FU	Fluorouracilo
BVU	Bromovinyluracil
ODN	Oligodeoxinucleótido
DCs	Células dendríticas
FMT	Trasplante de microbiota fecal
AUC	Área bajo la curva
CMV	Citomegalovirus

Bibliografía

Amrane, Sophie, Didier Raoult, and Jean Christophe Lagier. 2018. «Metagenomics, culturomics, and the human gut microbiota». *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 16 (5): 373-75. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1467268>.

Arumugam, Manimozhiyan, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Gabriel R. Fernandes, et al. 2011. «Enterotypes of the Human Gut Microbiome». *Nature* 473 (7346): 174-80.
<https://doi.org/10.1038/nature09944>.

Cani, Patrice D, and Benedicte F. Jordan. 2018. «Gut Microbiota-Mediated Inflammation in Obesity: A Link with Gastrointestinal Cancer». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 15 (11): 671-82.
<https://doi.org/10.1038/s41575-018-0025-6>.

Cheng, Mingyue, and Kang Ning. 2019. «Stereotypes About Enterotype : the Old and New Ideas». *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 17 (1): 4-12.
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.02.004>.

Cheng, Yiwen, Zongxin Ling, and Lanjuan Li. 2020. «The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer». *Frontiers in Immunology* 11.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615056>.

Costea, Paul I., Falk Hildebrand, Manimozhiyan Arumugam, Fredrik Bäckhed, Martin J. Blaser, Frederic D. Bushman, Willem M. de Vos, et al. 2018. «Enterotypes in the Landscape of Gut Microbial Community Composition». *Nature Microbiology* 3 (1): 8-16. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>.

Donaldson, Gregory P., S. Melanie Lee, and Sarkis K. Mazmanian. 2016. «Gut Biogeography of the Bacterial Microbiota». *Nature Reviews. Microbiology* 14 (1): 20-32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>.

Fong, Winnie, Qing Li, and Jun Yu. 2020. «Gut Microbiota Modulation: A Novel Strategy for Prevention and Treatment of Colorectal Cancer». *Oncogene* 39 (26): 4925-43. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1341-1>.

Gagnière, Johan, Jennifer Raisch, Julie Veziat, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, Emmanuel Buc, Marie-Agnès Bringer, Denis Pezet, and Mathilde Bonnet. 2016. «Gut microbiota imbalance and colorectal cancer». *World Journal of Gastroenterology* 22 (2): 501-18. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501>.

- Garrett, Wendy S. 2019. «The Gut Microbiota and Colon Cancer». *Science (New York, N.Y.)* 364 (6446): 1133-35. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2367>.
- Gutleben, Johanna, Maryam Chaib De Mares, Jan Dirk van Elsas, Hauke Smidt, Jörg Overmann, and Detmer Sipkema. 2018. «The Multi-Omics Promise in Context: From Sequence to Microbial Isolate». *Critical Reviews in Microbiology* 44 (2): 212-29. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332003>.
- Jandhyala, Sai Manasa, Rupjyoti Talukdar, Chivkula Subramanyam, Harish Vuyyuru, Mitnala Sasikala, and D Nageshwar Reddy. 2015. «Role of the normal gut microbiota». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 21 (29): 8787-8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>.
- Janney, Alina, Fiona Powrie, and Elizabeth H. Mann. 2020. «Host–Microbiota Maladaptation in Colorectal Cancer». *Nature* 585 (7826): 509-17. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2729-3>.
- Keum, NaNa, and Edward Giovannucci. 2019. «Global Burden of Colorectal Cancer: Emerging Trends, Risk Factors and Prevention Strategies». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (12): 713-32. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>.
- Koliarakis, Ioannis, Ippokratis Messaritakis, Taxiarchis Konstantinos Nikolouzakis, George Hamilos, John Souglakos, and John Tsiaoussis. 2019. «Oral Bacteria and Intestinal Dysbiosis in Colorectal Cancer». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174146>.
- Malla, Muneer Ahmad, Anamika Dubey, Ashwani Kumar, and Shweta Yadav. 2019. «Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment» 9 (January): 1-23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02868>.
- Murphy, Neil, Victor Moreno, David J. Hughes, Ludmila Vodicka, Pavel Vodicka, Elom K. Aglago, Marc J. Gunter, and Mazda Jenab. 2019. «Lifestyle and dietary

environmental factors in colorectal cancer susceptibility». *Molecular Aspects of Medicine* 69 (March): 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005>.

Nistal, Esther, Nereida Fernández-Fernández, Santiago Vivas, and José Luis Olcoz. 2015. «Factors Determining Colorectal Cancer: The Role of the Intestinal Microbiota». *Frontiers in Oncology* 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00220>.

Saus, Ester, Susana Iraola-Guzmán, Jesse R. Willis, Anna Brunet-Vega, and Toni Gabaldón. 2019. «Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential». *Molecular Aspects of Medicine* 69 (March): 93-106. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.05.001>.

Sender, Ron, Shai Fuchs, and Ron Milo. 2016. «Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body», 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.

Shabana, null, Saleem U. Shahid, and Uzma Irfan. 2018. «The Gut Microbiota and Its Potential Role in Obesity». *Future Microbiology* 13: 589-603. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0179>.

«The Integrative Human Microbiome Project». 2019. *Nature* 569 (7758): 641-48. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>.

Thursby, Elizabeth, and Nathalie Juge. 2017. «Introduction to the human gut microbiota». *Biochemical Journal* 474 (11): 1823-36. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>.

Tilg, Herbert, Timon E. Adolph, Romana R. Gerner, and Alexander R. Moschen. 2018. «The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer». *Cancer Cell* 33 (6): 954-64. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.004>.

Tropini, Carolina, Kristen A. Earle, Kerwyn Casey Huang, and Justin L. Sonnenburg. 2017. «The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function». *Cell Host & Microbe* 21 (4): 433-42. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.010>.

Villéger, Romain, Amélie Lopès, Guillaume Carrier, Julie Veziant, Elisabeth Billard, Nicolas Barnich, Johan Gagnière, Emilie Vazeille, and Mathilde Bonnet. 2019. «Intestinal Microbiota: A Novel Target to Improve Anti-Tumor Treatment?» *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184584>.

Villéger, Romain, Amélie Lopès, Julie Veziant, Johan Gagnière, Nicolas Barnich, Elisabeth Billard, Delphine Boucher, and Mathilde Bonnet. 2018. «Microbial Markers in Colorectal Cancer Detection and/or Prognosis». *World Journal of Gastroenterology* 24 (22): 2327-47. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i22.2327>.

Wirbel, Jakob, Paul Theodor Pyl, Ece Kartal, Konrad Zych, Alireza Kashani, Alessio Milanese, Jonas S. Fleck, et al. 2019. «Meta-Analysis of Fecal Metagenomes Reveals Global Microbial Signatures That Are Specific for Colorectal Cancer». *Nature Medicine* 25 (4): 679-89. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0406-6>.

Wong, Sunny H, and Jun Yu. 2019. «Gut Microbiota in Colorectal Cancer: Mechanisms of Action and Clinical Applications». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (11): 690-704. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0209-8>.

Zheng, Di-Wei, Xue Dong, Pei Pan, Ke-Wei Chen, Jin-Xuan Fan, Si-Xue Cheng, and Xian-Zheng Zhang. 2019. 'Phage-Guided Modulation of the Gut Microbiota of Mouse Models of Colorectal Cancer Augments Their Responses to Chemotherapy'. *Nature Biomedical Engineering* 3 (9): 717–28. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0423-2>.

Agradecimientos

Me gustaría dedicar unas últimas líneas a las personas que me han rodeado este último año de carrera y que de una forma u otra me han ayudado a realizar este trabajo.

A María, mi otra mitad, gracias por ser mi gran pilar y por tus consejos infinitos. Una gran parte de este trabajo es tuya.

A Samuel y a Elena, mi familia en Cantabria. Gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado y por portaros tan bien conmigo desde el primer día. Sois unas personas increíbles y nunca estaré completamente agradecido con vosotros.

A Daniel y Miguel mis dos hermanos. Gracias por el día a día, el gran ambiente de convivencia y sobre todo por la gran amistad que hemos forjado.

Por último gracias a Asunción, sin ella no cabe duda todo esto hubiese sido imposible. Gracias por tu paciencia infinita, las correcciones, el buen ambiente de trabajo que generas y la cercanía. Te prometo que algún día voy a aprender a usar Zotero.

Gracias a todos de corazón.